

생체발광을 이용한 생체재료 분석 기술

Bioluminescence-based Analytical Techniques for Biomaterials

정승오 · 최예빈 · 김혜민 | Seung Oh Jung · Yebin Choi · Hyemin Kim

Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University,
120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea
E-mail: khmin@konkuk.ac.kr

1. 서론

생체발광(bioluminescence)은 화학 반응의 결과로 방출되는 화학발광(chemiluminescence)의 일종으로 생물이 생화학 반응을 통해 스스로 생성하는 빛이다. 반딧불이, 심해생물 등 특정 생물은 의사소통과 먹잇감 유인 등을 위해 빛을 방출하며 이를 위해 루시페레이스(luciferase)라는 효소를 발현한다. 루시페레이스는 기질인 루시페린의 생화학 반응을 촉매하며 루시페레이스의 종류에 따라 고유의 파장과 속도(kinetics)를 가지고 빛을 생성한다. 생체발광은 일반적인 광원과는 달리 전기를 포함한 외부에너지를 필요로 하지 않고 따라서 빛 생성 시 열이 발생하지 않는다. 또한 생체영상화 과정에서 형광과 달리 자가발광이 없고, 생체 유래 물질에 의해 매개되어 안전하고 생체친화적이라는 특징을 가지고 있다. 따라서 생체발광은 생화학적 분석, 영상화, 광치료 등의 생명과학 분야에서 유용하게 활용되어 왔다.

이번 총설에서는 루시페레이스-루시페린 시스템의 유형별 생체발광의 특성을 살펴보고, 이를 생체재료의 분석에 어떻게 활용할 수 있는지 소개하고자 한다. 다양한 생물에서 발현되는 루시페레이스는 촉매 반응을 통해 빛을 생성한다는 공통점을 가지지만 각 유형에 따라 빛 생성에 필요한 환경과 생성된 빛의 특성이 다르다. 이러한 차이를 고려하여 특정 적용분야에 적합한 루시페레이스를 선택할 수 있다. 또한 생체발광을 생체재료 분석에 적용하는 실험방법론을 바탕으로 생체발광이 활발히 활용되고 있는 대표적인 사례를 소개하고, 향후 생체발광 기반 분석기술의 발전 및 확장 가능성에 대해 논의하고자 한다.

2. 본론

2.1 생체발광 시스템의 유형

다양한 종류의 루시페레이스는 각각의 최적 환경 조건에서 특정 루시페린 기질과 반응하여 빛을 생성한다.

Author



정승오

2024
2024-현재 건국대학교 화장품공학과 (학사)
건국대학교 화장품공학과 (석사)



최예빈

2021-현재 건국대학교 화장품공학과 (학사)



김혜민

2010 POSTECH 신소재공학과 (학사)
2015 POSTECH 신소재공학과 (박사)
2015-2017 (주)화이바이오메드 책임연구원
2017-2022 Imperial College London, Department of Materials (Post-Doc.)
2022-2023 연세대학교 의료원 (Post-Doc.)
2023-현재 건국대학교 화장품공학과 조교수

표 1. 대표적인 루시페레이스(luciferase)/루시페린(luciferin) 시스템

Luciferins	Luciferases (molecular weight)	Requirements for reactions	Wavelength (λ_{max} , nm)	Kinetics
D-Luciferin	Firefly luciferase (62 kDa)	ATP, Mg^{2+} , O_2	558	Glow
	<i>Renilla</i> luciferase (36 kDa)	O_2	480	Flash
Coelenterazine	<i>Gaussia</i> luciferase (20 kDa)	O_2	485	Flash
	<i>Oplophorus</i> luciferase (106 kDa)	O_2	454	Flash
Long-chain aldehyde	Bacterial luciferase (77 kDa)	FMNH ₂ , O_2	480	Flash

또한, 각 효소는 고유한 반응 동역학과 발광 파장을 가지며, 이러한 특성은 원하는 응용 분야에 가장 적합한 생체발광 시스템을 선택할 때 고려해야 할 중요한 요소이다(표 1).

2.1.1 D-루시페린 시스템

반딧불이 루시페레이스(firefly luciferase, FLuc)와 D-루시페린 시스템은 가장 널리 사용되는 생체발광 시스템이다. 반딧불이 루시페레이스는 ATP, Mg^{2+} 및 산소가 존재할 때 D-루시페린의 산화를 촉매하며 반응 과정에서 560 nm 부근의 빛을 방출한다.¹ 40종 이상의 반딧불이 종이 D-루시페린을 기질로 사용하며, *Photinus pyralis* 반딧불이 루시페레이스가 연구에서 가장 흔하게 사용된다. D-루시페린 생체발광 시스템은 ATP를 필요로 하여 자발적 산화에 의한 배경 신호에 덜 민감하기 때문에 간섭이 적고 정확한 결과를 얻을 수 있으며, 장시간 발광과 함께 높은 양자 수율을 나타낸다. 또한 D-루시페린은 수용성이 좋고 독성이 낮아 생체 내 시스템에 응용이 용이하기 때문에 치료·진단 분야에서 활발하게 사용되고 있다.²

2.1.2 코엘렌테라진(Coelenterazine) 시스템

코엘렌테라진은 해양생물이 발현하는 루시페레이스의 일반적인 기질이다. 코엘렌테라진을 기질로 가지는 루시페레이스는 *Renilla* 루시페레이스(RLuc), *Gaussia* 루시페레이스(GLuc) 및 *Oplophorus* 루시페레이스(OpLuc) 등이 대표적이며 산소가 존재할 때 코엘렌테라진을 들뜬 상태인 코엘렌테라미드로 산화시키는 역할을 한다.³ 코엘렌테라진과의 반응에서 RLuc 및 GLuc은 480 nm 부근에서 발광 피크를 가지고 OpLuc은 454 nm 부근에서 발광 피크를 가진다.^{4,5} 코엘렌테라진에 기반한 생체발광 반응은 ATP에 의존하지 않으므로 ATP가 고갈된 환경에서의 생체영상화에 적합하다. 반면 자발적 산화에는 취약하기 때문에 배경 신호에 의한 노이즈를 유발할 수 있으며 코엘렌테라진은 D-루시페린에 비해 수용성이 낮다는 단점이 있다. 코엘렌테라진에 의해 생성된 생체발광 반응의 동역학은 지속되는 발광보다는 섬광을 특징으로 한다.

2.1.3 박테리아 기반 시스템

박테리아 발광은 D-루시페린 또는 코엘렌테라진 시스템과

약간의 차이를 가진다. *Photorhabdus luminescens*와 같은 박테리아의 *lux* 오페론은 루시페레이스와 기질 루시페린을 합성하는 유전자를 인코딩 한다. 박테리아 기반 시스템은 490 nm 부근의 빛을 방출하며 외인성 기질을 필요로 하지 않는다는 장점을 가진다. 따라서 포유류 세포의 리포터 시스템으로 *lux* 오페론을 엔지니어링하려는 연구가 시도되고 있다.

2.2 생체발광 기반 분석법

발광 기반 분석법에는 크게 형광 단백질에서 유래하는 형광과 루시페레이스에서 유래하는 생체발광을 활용할 수 있다. 형광에 비해 생체발광은 광도가 낮지만 배경 신호가 매우 낮기 때문에 형광 리포터보다 높은 민감도를 가질 수 있다.⁸ 또한 형광은 빛에 민감한 조직에 영향을 미칠 수 있고, 세포에 광독성 손상을 일으킬 수 있는 반면에 생체발광은 외부 광원을 필요로 하지 않기 때문에 안전성 측면에서 이점을 가진다. 따라서 생체발광 기반 분석법은 살아있는 세포, 조직 및 전체 동물에 대한 다양한 유형의 연구에 활발히 활용되어 왔다.

2.2.1 세포 기반 분석(Cell-Based Assays)

세포 기반 분석은 생체발광 기반 분석법에서 유전자 발현 분석과 약물 효능 평가에 널리 활용되고 있다. 이러한 기술은 세포 내에서 발생하는 생물학적 현상을 실시간으로 모니터링 하고 정량화하는 데 유용하다. FLuc 및 RLuc 생체발광의 가장 일반적인 응용은 세포 내 유전자 발현을 연구하기 위한 리포터 유전자로 사용하는 것이다. 일반적으로 분석하고자 하는 표적 유전자를 생체발광 리포터 유전자와 연결하고 생체발광을 측정하여 표적 유전자의 발현을 정성·정량적으로 분석할 수 있다. 또한 ATP에 의존적인 D-루시페린 시스템의 발광 특성에 기반하여 세포 내 ATP 정량 분석에도 널리 활용되고 있다.

최근 연구에서는 그림 1과 같이 서로 다른 숙주 세포 유형에서 다양한 코로나바이러스의 감염성을 확인하는데 세포 기반 분석법을 사용하였다.⁹ 연구진은 표면에 코로나 균주의 스파이크 단백질을 가지고 있고 내부에 FLuc을 인코딩하는 유전 물질을 가지는 균주를 제조하였다. 세포가

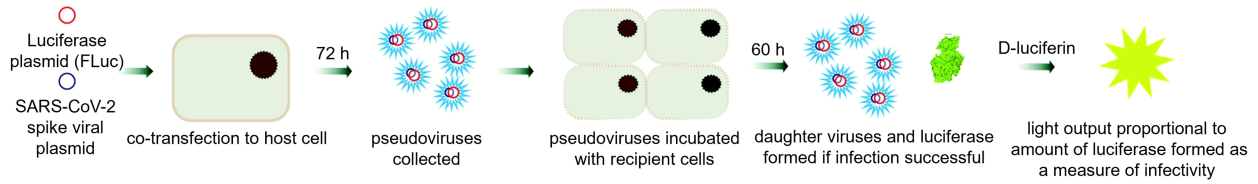


그림 1. FLuc/D-루시페린 기반 분석법을 활용한 코로나 바이러스 감염성 분석.⁹

바이러스에 감염되면 자손 바이러스와 FLuc이 생산되고, D-루시페린을 첨가하였을 때 발생하는 발광 신호를 측정하여 감염 여부를 판단하였다.

2.2.2 분자 상호작용 분석

루시페레이스는 단독으로 사용될 수 있지만 다른 형광제와 결합하여 사용할 수도 있다. 생체발광 공여체(donor)와 형광 수용체(acceptor)가 아주 가깝게 위치할 때, 두 물질 사이에서 에너지 전달이 발생하는데, 이를 생체발광 공명 에너지 전달(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)이라고 한다.¹⁰ BRET은 공여체에서 수용체로의 비복사적 에너지 전달을 수반하며, 이는 공여체와 수용체 사이의 거리가 10 nm 미만일 때 주로 발생한다. BRET 효율은 공여체와 수용체의 근접성에 따라 달라지므로 상호 작용하는 생체 분자 사이의 거리를 추정하는 데 활용할 수 있다. BRET은 생체의학적 응용 분야에 여러 가지 이점을 제공한다. 형광 수용체는 생체발광 공여체로부터 전달된 에너지에 의해 여기되므로 수용체의 발광 파장은 일반적으로 공여체의 발광 파장보다 길어 생체 영상화에서 조직 투과도를 향상시킬 수 있다. 또한 결합하는 단백질의 특성을 이용하여 종양치료를 포함한 비침습적인 치료에도 활용되고 있다.

그림 2의 예시에서 볼 수 있듯이 생체발광 공여체인 루시페레이스 NanoLuc과 형광 수용체인 mNeonGreen을 접합하여 BRET 시스템을 고안하고 분자 장력 센서의 거리 리포터로 사용하였다.¹¹ 산소가 있는 상태에서 기질인 furimazine(Fz)을 첨가하면 생체발광이 발생하고 이에 따라 BRET 현상이 일어난다. 힘(f)의 유무에 따라 공여와 수용체 사이의 거리가

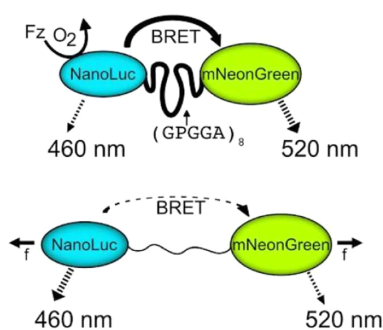


그림 2. BRET 기반 분자 장력 센서. 생체발광 공여체인 NanoLuc과 형광 수용체인 mNeonGreen의 거리에 따라 BRET 신호가 변화한다.¹¹

변하면서 이에 따른 BRET 효율이 변하기 때문에 BRET 신호를 관찰하여 분자 간 장력을 분석할 수 있다. BRET을 이용한 분자 장력 센서는 자가 형광 및 광독성이 없기 때문에 더 민감한 판독이 가능하고 광원의 사용이 어려운 깊은 조직 내에서 사용할 수 있다.

2.2.3 체내 영상화(In vivo Imaging)

생체발광 이미징(bioluminescence imaging, BLI)은 높은 민감도와 비침습성을 가지며, 실시간 모니터링이 가능한 유망한 영상 기법이다. 초기에는 주로 피하 종양 추적과 유전자 발현 모니터링에 활용되었으나, 최근에는 광학적 특성 개선에 따라 응용 범위가 확대되고 있다.⁸ 루시페레이스 리포터 유전자는 유전공학 기술을 통해 세포에 도입되며, 세포에서 발현되는 루시페레이스가 기질과 반응할 때 방출되는 빛을 CCD 카메라로 감지한다. 이를 통해 생체발광 이미징은 암 대사, 세포자멸사(apoptosis), 종양 저산소증(hypoxia), 혈관형성(angiogenesis) 및 치료 반응 연구에 중요한 역할을 한다.¹² 그림 3의 예시에서 볼 수 있듯이 FLuc 발현 형질전환 마우스를 사용하여 간세포암의

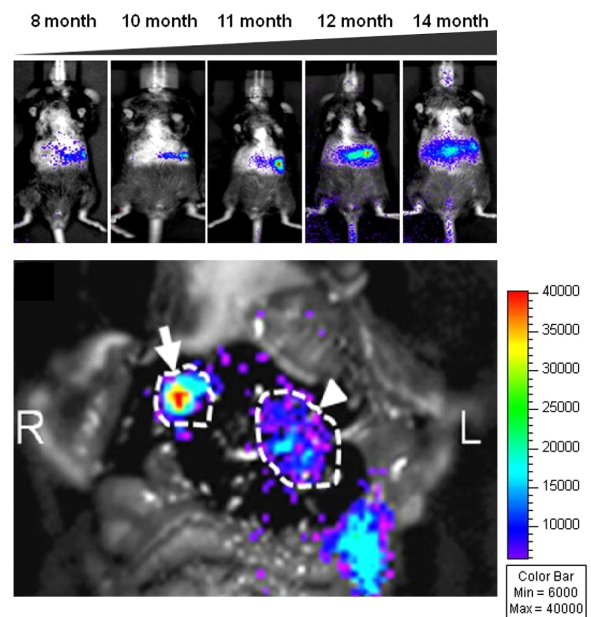


그림 3. 형질전환 마우스에서 유도된 간세포암의 BLI. 간세포암 유도 물질 처리 8개월 후부터 6개월 동안 형질전환 마우스의 BLI를 수행하였다(위쪽). 실험 종료 후 ex vivo BLI를 통해 생체발광 신호의 분포를 확인할 수 있다(아래쪽).¹³

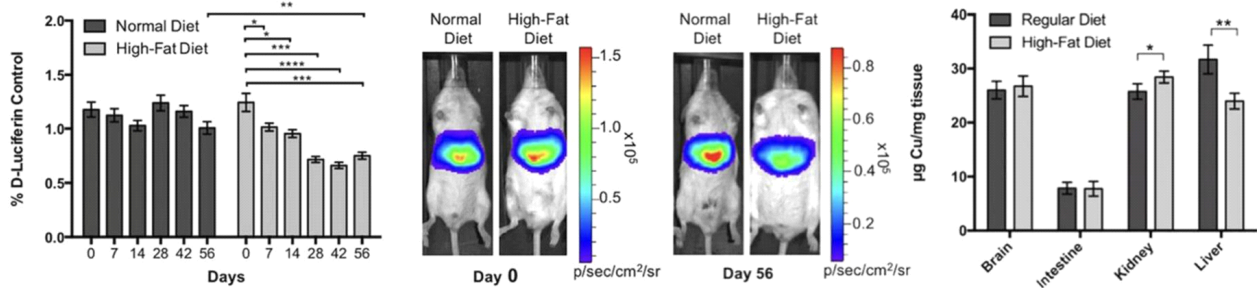


그림 4. Copper-caged luciferin-1(CCL-1)을 활용한 체내 구리 결핍 영상화 분석. 고지방 식이로 인한 간 조직 내 구리 결핍에 따라 생체발광 신호가 감소하는 것을 이용하여 체내 구리 결핍 현상을 정량분석하고(왼쪽) 영상화하였다(가운데). 분석 결과는 ICP-MS로 측정된 간 구리 농도(오른쪽)와 일치하는 경향을 보였다.¹⁴

성장을 BLI로 추적할 수 있다.¹³ 간세포암 유도물질 처리 후 복부에서 나타나는 발광 신호의 지속적인 증가를 통해 간세포암의 발생과 성장을 확인할 수 있다. 실험 후에는 *ex vivo* BLI를 통해 구체적인 신호 발생 위치를 확인할 수 있다.

또한 생체발광 이미징은 단순한 세포 분포 확인 외에도 생체 현상을 시각화하는 데 활용될 수 있다. 그 예로 지방간 질환 모델에서 간 조직 내 구리 결핍을 모니터링하는 데 생체발광 시스템을 적용할 수 있다. 해당 연구에서는 구리 농도가 높은 환경에서 생체발광을 생성하는 copper-caged luciferin-1(CCL-1)을 합성하고 이를 통해 생체 내 구리 농도를 영상화하였다. 그림 4에서는 이러한 시스템을 통해 고지방 식이에 의한 체내 구리 결핍 현상을 영상화한 결과를 볼 수 있으며, 분석 결과는 유도 결합 플라즈마 질량분석법(ICP-MS) 결과와 일치하여 생체발광 이미징의 높은 민감도와 응용 가능성을 입증하였다.¹⁴

3. 결론

생체발광 시스템을 이용한 분석법은 이번 총설에서 다룬 것처럼 세포 기반 분석과 종양 추적, 질병 진단에 응용될 뿐 아니라 의약품 개발 등 다양한 생명과학 연구 및 산업적인 부분에도 접목되고 있다. 생체발광 물질은 높은 민감도와 특이성을 가져 약물 스크리닝, 신호 전달 경로 분석 및 분자 상호작용 연구에서 유용하게 활용될 수 있다. 또한 생체발광 분석은 고속 스크리닝이 가능해 고효율 재료 분석에서 각광받고 있다.

최근 생체발광 기술은 생체재료 분석뿐만 아니라, 수질 및 토양 내 오염 물질 검출을 비롯한 환경 분석에서도 활발히 연구되고 있으며 이는 생체발광 기술이 더 폭넓은 분야에서 사용될 수 있음을 시사한다. 기존 생체발광 기반 분석법의 성능을 개선하기 위하여 체내 안정성, 환경적인 요인에 따른

발광신호의 변화, 발광 강도 및 감도의 한계 등을 개선하기 위한 연구가 계속되고 있으며, 이에 따른 생체발광 활용분야의 확장 및 기술 산업화가 기대된다.

참고문헌

1. S. Liu, Y. Su, M. Z. Lin, and J. A. Ronald, *ACS Chem Biol*, **16**, 2707 (2021).
2. Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Enomoto, T. Irie, H. Kubota, Y. Ohmiya, and H. Akiyama, *Nat. Photon.*, **2**, 44 (2008).
3. T. Jiang, L. Du, and M. Li, *Photochem Photobiol. Sci.*, **15**, 466 (2016).
4. E. A. Hunt, A. Moutsopoulos, S. Ioannou, K. Ahern, K. Woodward, E. Dikici, S. Daunert, and S. K. Deo, *Sci. Rep.*, **6**, 26814 (2016).
5. H. Nakamura, C. Wu, A. Murai, S. Inouye, and O. Shimomura, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 6405 (1997).
6. S. Inouye and S. Sasaki, *Protein Expr. Purif.*, **56**, 261 (2007).
7. M. Hutchens and G. D. Luker, *Cell Microbiol.*, **9**, 2315 (2007).
8. H. Kim, S. O. Jung, S. Lee, and Y. Lee, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 7563 (2024).
9. A. J. Syed and J. C. Anderson, *Chem. Soc. Rev.*, **50**, 5668 (2021).
10. D. K. Welsh and S. A. Kay, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 73 (2005).
11. E. J. Aird, K. J. Tompkins, M. P. Ramirez, and W. R. Gordon, *ACS Sens.*, **5**, 34 (2020).
12. S. B. Mali, *Oral Oncol.*, **9**, 100127 (2024).
13. J. H. Park, K. I. Kim, Y. J. Lee, T. S. Lee, K. M. Kim, S.-S. Nahm, Y.-S. Park, G. J. Cheon, S. M. Lim, and J. H. Kang, *Cancer Lett.*, **310**, 53 (2011).
14. M. C. Heffern, H. M. Park, H. Y. Au-Yeung, G. C. Van de Bittner, C. M. Ackerman, A. Stahl, and C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **113**, 14219 (2016).