

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하
본 보고서를 "질병원인 규명 및 극복을 위한 단일분자 수준 실시간 동영상 나노형광 분광법 개발"과제의 보고서로 제출합니다.

2011. 9. 23

주관연구기관명 : 한국화학연구원
주관연구책임자 : 이강택
연구원 : 전기석
" : 남상환
" : 배윤미
" : 김문석
" : 박정규
" : 이종국
" : 홍성철

협동연구기관명 :
협동연구책임자 :

보고서 초록

과제관리번호	2008-2002523	해당단계 연구기간	36개월	단계 구분	총단계
연구사업명	중 사업명	나노소재기술개발사업			
	세부사업명	차세대 나노원천기술개발사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	질병원인 규명 및 극복을 위한 단일분자 수준 실시간 동영상 나노형광 분광법 개발			
연구책임자	이강택	해당단계 참여연구원수	총 : 17 명 내부 : 7 명 외부 : 10 명	해당단계 연구비	정부: 300,000 천원 기업: 0 천원 계: 300,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국화학연구원 나노바이오융합연구센터		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 : 서울대학교(1차년도)		연구책임자 : 홍성철		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<ul style="list-style-type: none"> ○ 고감도 나노형광분광장치를 제작하고 최적화함 ○ 나노형광분광장치를 <i>in vitro</i> 시스템에 적용함 ○ NIR을 흡수, 가시광선 영역에서 발광하는 나노입자(UCNPs)의 발광 특성을 최초로 단일입자 수준에서 측정함 ○ 나노입자(UCNPs)의 결정구조에 따른 발광 특성 변화에 대한 측정 연구를 수행함 ○ 나노입자의 세포 내 발광 특성을 측정함 ○ 세포 내 나노입자의 경로에 대한 장시간, 실시간 추적 이미징 기술을 개발함 ○ 세포 내 나노입자의 분포 변화를 모니터링하는 이미징 기술을 개발함 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	나노형광분광법, 단일분자, 실시간 동영상, 나노입자, 나노검지			
	영 어	nanofluorescence imaging, single molecule, real-time imaging, nanoparticle, nanoprobng			

요약문

I. 제 목 : 질병원인 규명 및 극복을 위한 단일분자 수준 실시간 동영상 나노형광 분광법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

질병의 원인과 치료과정에 관련된 세포 내 기작을 실시간 이미징을 통해 단일 입자/단일분자 수준에서 규명하기 위한 목적으로 고감도 나노형광 분광 기술을 개발하고, 나노입자를 프로브로 이용한 장시간/실시간 live-cell imaging 실험을 수행함

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 나노형광분광장치 제작 및 최적화
 - Diode laser system, inverted microscope system, EMCCD (electron multiplying CCD)의 유기적 결합을 통한 고감도 나노형광 분광장치를 제작함
 - 나노형광분광장치를 이용하여 생체분자 및 나노입자의 동력학적 현상을 실시간으로 단일분자/단일입자 수준에서 측정함
- 단일 나노입자의 발광 측정
 - Upconverting nanoparticle (UCNP)의 광학적 특성을 단일입자 수준에서 최초로 측정함
 - UCNP의 photoblinking 및 photobleaching 현상의 유무를 조사하여 세포 등의 생체이미징 나노프로브로서의 적합성을 평가함
- 세포 내에서의 나노입자 이미징
 - UCNP가 세포 내에서 동적으로 거동하는 현상을 단일입자 수준의 실시간 이미징을 통해 직접적으로 관찰하고 궤적을 분석함
 - 나노입자/약물 전달, 바이러스 감염 등과 관련된 세포 기작을 조사함
- 세포 이미징 나노프로브 평가
 - 근적외선 흡수/가시광선 발광의 특성을 가진 UCNP의 세포독성을 조사함
 - 근적외선 사용을 통해 얻을 수 있는 이점을 체계적으로 조사함 (예: photodamage, autofluorescence 유무)

IV. 연구개발결과

- 질병의 원인과 치료과정에 관여하는 세포 기작을 단일분자/단일입자 수준에서 실시간 동영상으로 관찰할 수 있는 새로운 나노형광 분광법을 개발함
- 질병의 원인 규명과 치료과정에 관련된 생분자의 구조 및 상호작용을 단일분자 수준에서 규명하기 위해 단일분자 형광공명에너지전달법 등의 나노형광 분광법을 적용함
- 새로운 발광성 나노입자로 각광받고 있는 upconverting nanoparticles (UCNP)의 광학적 특성을 최초로 단일입자 수준에서 규명하고 photoblinking 및 photobleaching이 없는 이상적인 세포 이미징 나노프로브로 사용될 수 있음을 확인함 (2009년, *Advanced Materials* 논문 게재)
- UCNP가 세포 내에서 동적으로 거동하는 현상을 단일입자 수준의 실시간 이미징을 통해 직접적으로 관찰하고 궤적을 분석함으로써 나노입자/약물 전달, 바이러스 감염 등과 관련된 세포 기작 (예: active particle transport)을 규명함 (2011년, *Angewandte Chemie International Edition* 논문 게재 승인)
- 근적외선 흡수/가시광선 발광의 특성을 가진 UCNP를 세포 이미징 나노프로브로 사용할 경우 세포에 대한 광독성(photodamage)을 줄일 수 있고, 프로브와 관계없이 세포질 상에서 발생하는 autofluorescence background가 관찰되지 않음을 발견함

V. 연구개발결과의 기대효과

본 과제에서 개발한 실시간 동영상 나노형광 분광법은 생체분자의 구조 및 활성, 나노입자와 세포와의 상호작용을 단일분자/단일입자 수준에서 실시간 동영상 촬영을 통해 분석하는 기술로서, post-genome 시대의 이미징 기술에 기반한 생명과학 연구에 필수적인 핵심기술로 사용될 것이며, 질병원인 규명 및 치료 등의 생의학적 응용성 또한 매우 클 것으로 기대됨

SUMMARY

We developed a real-time nano-fluorescence imaging technique with capability of multi-color fluorescence detection. This technique was used for the single-molecule/single-particle studies on structural dynamics of and interactions between biological molecules, nanoparticles and living cells that are involved in pathogenetic and therapeutic mechanisms.

- We developed a novel nano-fluorescence imaging technique by which the structural dynamics and intermolecular interactions can be monitored in real time.
- We measured the optical (luminescent) properties of upconverting nanoparticles (UCNPs) at the single particle level for the first time
- The luminescence of UCNPs turned out to be free of photoblinking and photobleaching (*Advanced Materials*, 2009).
- We visualized in real time the dynamic trajectories of UCNPs in living cells and revealed various transport mechanisms that are involved in nanoparticle/drug delivery and virus infection. (*Angewandte Chemie International Edition*, 2011, in press)
- By employing near-infrared excitation for UCNPs in cells, we could minimized the degree of photodamage to cells and achieved autofluorescence-free cellular imaging

The real-time nano-fluorescence imaging technique in combination with optically superb nanoparticle systems is capable of analyzing the biological structural dynamics, interactions, and activity at the single-molecule/single-particle level, which will become a principal methodology for the study of pathogenetic and therapeutic mechanisms in the field of biomedicine.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the R&D project

Chapter 2. Current status of international and domestic R&D projects

Chapter 3. Contents and results of the project

Chapter 4. Achievements and contribution to the related areas

Chapter 5. Application plan

Chapter 6. Collected information on the international R&D

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적 및 범위

1. 나노형광분광장치 제작 및 최적화
 - 가. Diode laser system, inverted microscope system, EMCCD (electron multiplying CCD)의 유기적 결합을 통한 고감도 나노형광 분광장치를 제작함
 - 나. 나노형광분광장치를 이용하여 생체분자 및 나노입자의 동력학적 현상을 실시간으로 단일분자/단일입자 수준에서 측정함

2. 단일 나노입자의 발광 측정
 - 가. Upconverting nanoparticle (UCNP)의 광학적 특성을 단일입자 수준에서 최초로 측정함
 - 나. UCNP의 photoblinking 및 photobleaching 현상의 유무를 조사하여 세포 등의 생체이미징 나노프로브로서의 적합성을 평가함

3. 세포 내에서의 나노입자 이미징
 - 가. UCNP가 세포 내에서 동적으로 거동하는 현상을 단일입자 수준의 실시간 이미징을 통해 직접적으로 관찰하고 궤적을 분석함
 - 나. 나노입자/약물 전달, 바이러스 감염 등과 관련된 세포 기작을 조사함

4. 세포 이미징 나노프로브 평가
 - 가. 근적외선 흡수/가시광선 발광의 특성을 가진 UCNP의 세포독성을 조사함
 - 나. 근적외선 사용을 통해 얻을 수 있는 이점을 체계적으로 조사함 (예: photodamage, autofluorescence 유무)

제2절 연구개발의 필요성

1. 최근 물리, 화학 분야에서 눈부신 발전을 거듭한 단일분자 수준의 분광 측정법을 생의학적 문제에 적용하고자 하는 연구가 전 세계적으로 큰 관심 속에 진행되고 있음
 - 가. 수많은 분자들의 집합체인 생체 시스템에 대한 기존의 생화학적, 분자생물학, 세포생물학적 연구는 생분자들의 구조와 동력학에 대한 중요한 정보를 제공해 왔지만, 측정 과정에 필연적으로 수반되는 앙상블 평균화(ensemble averaging) 때문에 분자 수준의 미시적인 정보에 대해서는 대부분 추론에 의존해야 했음
 - 나. 최근 태동한 단일분자 수준의 나노형광 분광법을 통해 개별 분자의 구조와

불균일하게 분포하는 생체 활성을 궁극적인 측정 한계인 단일 분자 수준에서 직접적으로 관찰하는 것이 가능해졌으며, 기존의 방법으로는 불가능했던 생분자의 생체활성 기작에 대해 전례 없이 구체적이고 자세한 정보를 얻을 수 있게 되었음

다. 특히 나노형광분광법을 대면적 실시간 동영상법과 결합하여 생체 시스템의 구조 변화와 생체 활성을 실시간으로 추적하는 연구가 최근에 미국 등 선진국에서 활발히 개발되고 있음

(1) 최근 수년 사이에 이루어진 초고감도 광검출기(EMCCD, electron multiplying charge coupled device)의 개발에 힘입어 도립 형광 현미경을 이용한 대면적 동영상법(wide-field imaging)의 검출 감도를 단일 형광 분자 수준으로 높일 수 있게 되었고, 시간분해능이 수 밀리초 이하까지 향상되면서 video rate의 실시간 동영상을 기록하는 것이 가능해졌음

(2) 측정 장비 및 기술의 눈부신 발전을 통해 단일분자의 구조 변화와 생체 활성에 대한 실시간 동영상 측정이 최근에 이르러 드디어 가능해 졌으며, 이를 이용하여 동적인 생체 시스템을 연구하고자 하는 시도가 활발히 시작되고 있음

2. 본 과제에서 개발하고자 하는 단일분자 수준 실시간 동영상 나노형광 분광법은 질병원인 규명 및 이의 극복과 관련된 다양한 연구에 널리 응용될 수 있음

(1) DNA-단백질(효소) 결합체의 구조 동력학적 특징과 미시적 상호작용을 형광 공명에너지전달법이나 실시간 멀티컬러 동시 이미징법 등을 통해 관련 기작을 규명함으로써 궁극적으로 유전자 질환의 조기 진단 및 치료 기술 개발에 결정적인 역할을 할 수 있을 것임

(2) 발광 특성을 가지는 나노입자의 세포 내 이동 과정을 실시간 추적하여 단일 분자 수준의 transport mechanism을 규명함으로써 효과적인 약물 전달체의 개발에 응용될 수 있음

(3) 최근 전세계적으로 활발히 개발되고 있는 생체기능성 발광 나노입자들의 암 세포 표적 및 괴멸 등의 역할을 하는데, 실시간 동영상 나노형광 분광법을 통해 이들의 광학적 특성(photobleaching, blinking 등)을 분석하고, 실제로 세포와 결합하는 과정에서의 선택성과 같은 다양한 생리학적 특성을 정량적으로 측정할 수 있으므로 나노바이오 진단 및 치료 분야의 핵심 기술로 발전할 것이 확실함

2. 경제·산업적측면

가. 유전자 질환, 신약 개발, 약물 전달, 나노바이오 진단 및 치료 등에 이용할 수 있는 분석 도구 및 장비와 관련하여 규모가 큰 시장 창출이 가능함

- 나. 유전자 질환은 그 종류가 다양하고 증상이 매우 치명적이기 때문에 진단과 치료 시장의 규모가 매우 크므로 실시간 동영상 나노형광 동영상 분광법을 통해 DNA 손상 및 회복의 구체적인 기작이 규명될 경우, 새로운 진단제, 치료제의 개발을 촉진하게 되어 국가 의료 산업의 경쟁력 제고에 크게 기여할 것임
- 다. 최근 신약 개발 분야의 가장 중요한 이슈 중 하나인 생리활성 저분자의 표적 규명, 즉 작용점 탐색 과정에 대한 연구가 단일분자 수준에서 이루어질 경우 새로운 형태의 신약 스크리닝 시장의 형성이 가능해짐
- 라. 최근 많은 각광을 받고 있는 나노바이오 진단 및 치료 시장의 가장 중요한 돌파구는 선택성과 특이성이 높은 생체적합성 나노입자의 개발과 이들의 형광을 이용한 나노분광법으로 생리활성 과정을 이미징하고 정량화하는 것임
- 마. 본 과제의 목표인 실시간 동영상 나노형광 분광법은 21세기 생명 공학 산업의 새로운 초석을 마련할 뿐만 아니라, 의학 발전에도 중추적 역할을 담당할 핵심 기반 기술이 될 것임

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 지금까지의 연구개발 실적

1. 단일입자 추적 (Single Particle Tracking) 연구

단일 입자 혹은 단일 분자의 시간에 따른 궤적을 추적하는 연구로서, 일리노이 대학의 Paul Selvin 교수가 대표적인 연구자라고 할 수 있음. 단일 입자(분자)로부터 방출되는 발광(형광)의 이미징을 PSF(point spread function)으로 fitting하여 입자의 중심 위치를 수 나노미터(nm)의 정확도로 결정하는 기술을 이용해, 나노미터 영역에서 움직이는 입자의 궤적을 얻어냄. 일례로, 염료 분자로 형광 표지된 모터 단백질(motor protein) myosin V 단일 분자가 actin filament상에서 ATP 가수분해당 37 nm의 거리를 이동함을 실제로 관찰하여 2003년 Science에 발표하였음. 특히 염료 분자의 표지 방식을 교묘히 설계함으로써 myosin V가 소위 hand-over-hand mechanism으로 운동함을 밝혀 내었음. (그림 1)

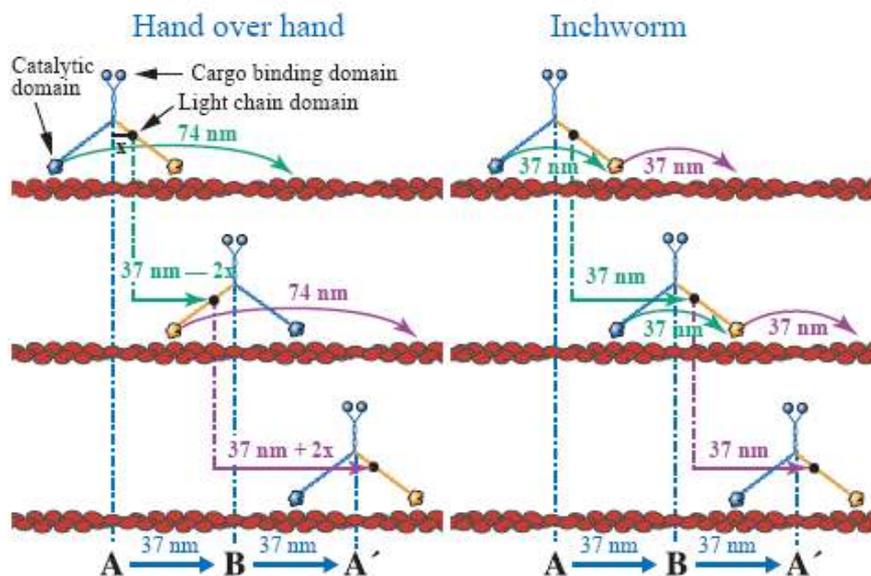


그림 1. Myosin V의 운동에 대한 두 가지 가설 (hand-over-hand, inchworm)과 이를 구별하기 위한 염료분자 표지설계 개념도 [1]

2. TIRF(total internal reflection fluorescence) microscopy를 이용한 단일 분자 분광학 (single-molecule spectroscopy)

일리노이 대학의 Taekjip Ha (하택집) 교수 연구진과 하버드 대학의

Xiaowei Zhuang 교수 연구진에서는 소위 단일분자(single molecule) 형광공명에너지전달(FRET, fluorescence resonance energy transfer) 방법을 이용하여 단일 생분자의 구조 변화와 상호작용 연구의 기초를 닦았음. 즉, DNA와 RNA와 같은 핵산 분자 혹은 단백질의 구조 동력학(conformational dynamics)을 실시간으로 추적하여 기존의 생화학적, 분자생물학적 실험에서 확인하기 힘든 관련 분자 기작을 규명하는 성과를 올림. 예를 들어, 최근 2005년에 하택집 교수 연구진은 Rep helicase와 DNA의 반복적인 상호작용을 단일분자 FRET을 통해 실시간 관찰하였음. (그림 2)

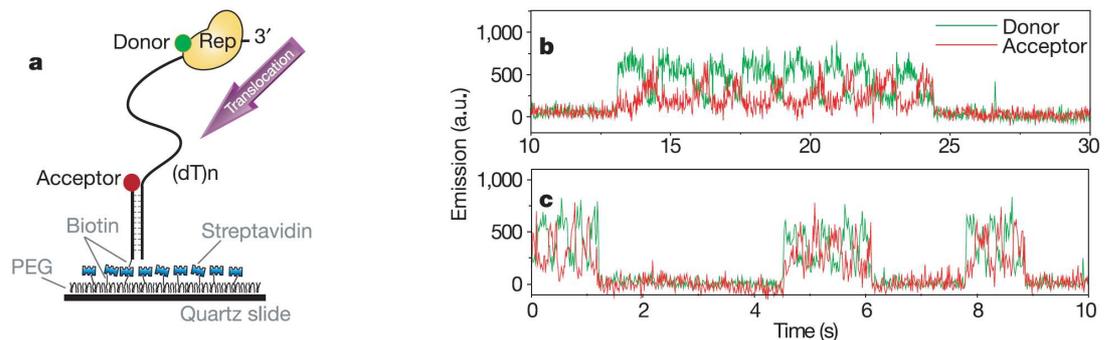


그림 2. 단일분자 형광공명에너지전달법으로 관찰한 Rep helicase와 DNA의 상호작용 [2]

3. 초고분해능 형광 이미징 (Super-Resolution Fluorescence Imaging)의 개발

빛을 이용한 광학 이미징은 빛의 회절 한계(diffraction limit)로 인해 파장의 1/2 정도에 해당하는 공간적 분해능을 가질 수밖에 없음. 이와 같은 분해능으로는 세포내에 밀집해 존재하는 다양한 기관 및 분자들을 개별적으로 이미징하는데 큰 어려움이 따르는데, 이를 극복하는 방법으로 최근 소위 super-resolution microscopy법들이 개발되고 있음. 대표적인 기술로 독일 막스-플랑크 연구소의 Stefan Hell 등에 의해 개발된 4Pi, STED(stimulated emission depletion) microscopy, 미국 하버드 대학의 Xiaowei Zhuang 등에 의해 개발된 STORM (stochastic optical reconstruction microscopy), 미국의 Eric Betzig 등에 의해 개발된 PALM (photoactive localization microscopy)을 들 수 있음. (그림 3) 이들 방법은 아직까지는 매우 한정된 시스템에 적용되고 있는 실정이며 보다 일반적인 응용을 위해 지속적인 개선이 시도되고 있음

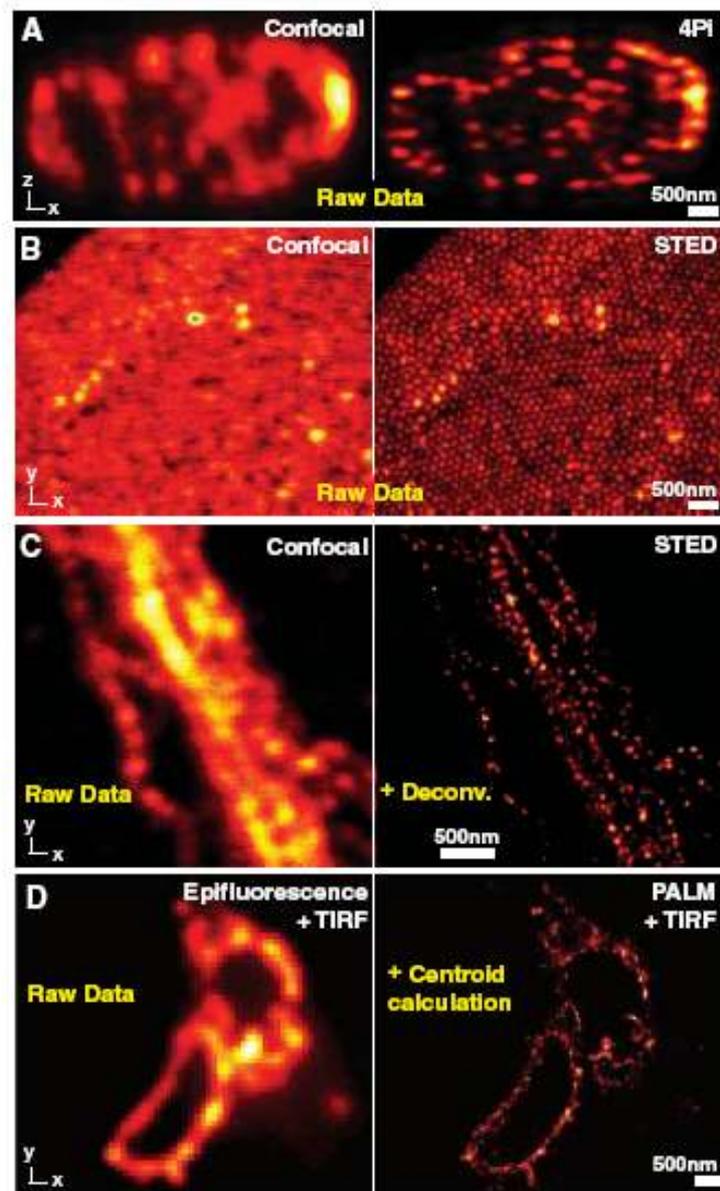


그림 3. 기존의 형광 이미징법(왼쪽)과 super-resolution 이미징법(오른쪽)의 비교 [3]

4. CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) 현미경법

형광 이미징 기술이 가지는 단점 중의 하나는 원하는 분자에 형광체를 표지해야 한다는 점인데, 이는 생분자의 활성에 원하지 않는 영향을 줄 수 있기 때문이다. 하버드 대학의 X. Sunney Xie 교수 연구진에서 개발된 CARS는 형광체의 전자전이(electronic transition)를 통한 형광 현상을 이용하는 형광 이미징과 달리, CARS는 분자의 특정 진동모드(vibrational mode)의 enhanced Raman signal을 이용하여 세포 등의 시스템을 이미징함. 형광 이미징에서와 같이 인위적인 형광체를 관찰하고자 하는 대상에 표지하지 않고

그 자체의 진동모드를 이용한다는 것이 기술적인 장점으로 인해 CARS의 의학적 응용성이 활발히 연구되고 있음. 이 방법을 이용해 Xie 그룹에서는 세포내 lipid 분자들이 운동 및 3차원 이미지, 더 나아가서는 동물 뇌의 이미징까지 시도한 바 있음. (그림 4)

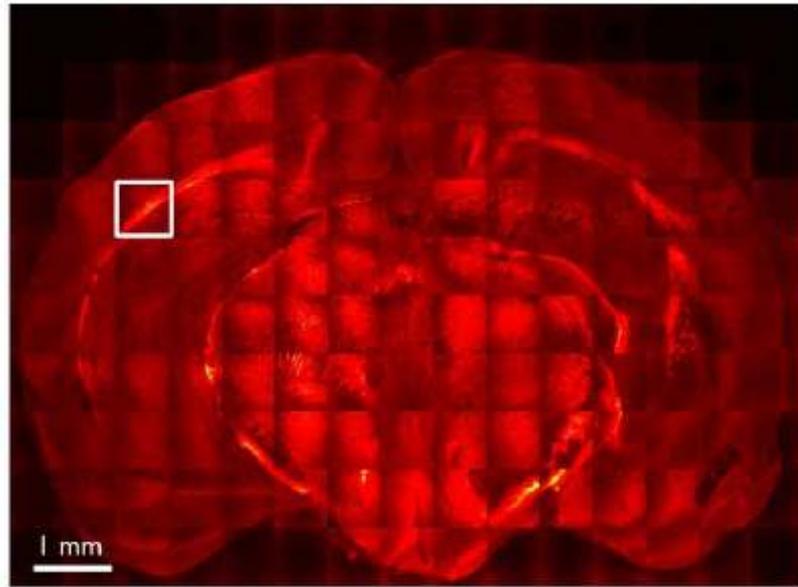


그림 4. CARS microscopy로 얻은 APP and PS1AD mouse의 뇌 이미지 [4]

5. 본 과제가 시작된 2008년, 국내에서는 단일 분자 수준의 나노형광 분광법을 이용하여 발표된 연구가 거의 전무한 실정였고, 서울대, KAIST, 한국화학연구원 등의 연구진에서 관련 연구가 시작 단계에 있었음
6. 본 과제를 통해 도출된 연구결과는 단일분자/단일입자 나노형광 분광법의 국내 연구 수준이 세계 수준에 도달하였음을 입증함 (그림 5, 6)

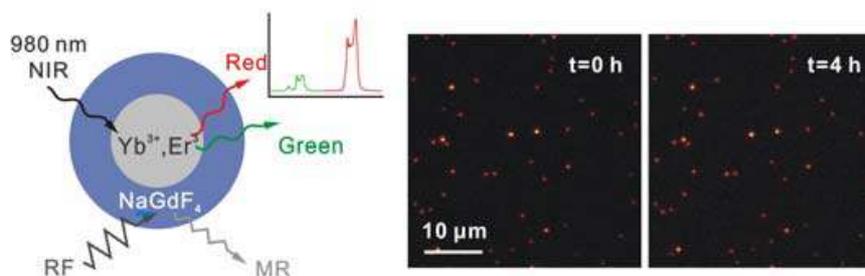


그림 5. UCNP의 구조 및 기능과 images [5]
(Park et al., *Adv. Mater.* 21, 4467, (2009).)

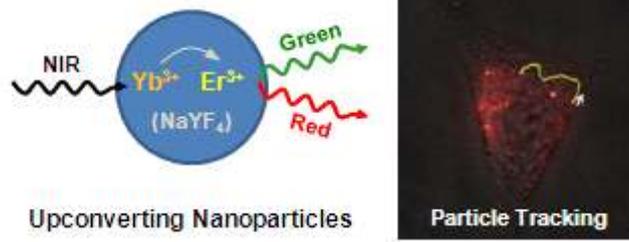


그림 6. 세포 내 UCNP의 실시간 추적 [6]
(Nam et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press (2011).)

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구범위 및 연구수행 방법

1. 1차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
나노형광분광장치 제작 및 최적화	- EMCCD를 이용한 단일 분자 수준의 형광 검출	<ul style="list-style-type: none"> - 고감도 EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device)를 광검출 모듈에 장착하여 최적화함 - 4종의 laser (532 nm, 632.8 nm, 980 nm, 514.5 nm)를 광원으로 사용할 수 있는 optical path를 고안하여 구축함 - Inverted microscope를 사용하여 objective-tipe TIRF나 Epifluorescence 이미징이 가능하도록 디자인함
나노형광 분광 장치의 <i>in vitro</i> 시스템에 대한 적용	- 단일분자 형광공명 에너지 전달 및 멀티컬러 동시 이미징법을 이용한 DNA 및 효소 결합체의 구조동력학 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 단일분자 형광공명 에너지 전달 검출을 위해 광검출 모듈의 multicolor beam path 를 고안하여 구축함 - 3종 이상의 laser과 형광공명 에너지전달 실험을 위해 구축된 광검출 모듈을 이용해 멀티컬러 동시이미징법을 수행함
형광 나노스코피 개발	- centroid 결정 방법	- 20-nm 공간분해능
DNA-단백질 상호작용	- 형광나노스코피 이용	- DNA와 RNA polymerase 및 전사인자와의 상호작용 연구

2. 2차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
○ 생체기능성 나노입자의 발광 측정	<ul style="list-style-type: none"> - Upconverting nanoparticle을 위한 photo-luminescence (발광) spectrum 측정 장치 구축 - 나노형광 이미징 장비로 Photobleaching 실험 	<ul style="list-style-type: none"> - 1차년도에 구축한 나노형광 이미징 장비 외에 새로운 upconverting nanoparticle 전용 spectrometer를 신규 제작함 (980 nm diode laser, mirror, monochromator, CCD camera로 구성) - 일반적인 fluorometer에서 측정이 불가능한 upconversion photo-luminescence를 상기 spectrometer를 이용해 수시로 측정함 - 나노형광 이미징 장비를 이용하여 Upconverting nanoparticle을 연속적으로 여기한 후 photobleaching의 여부를 조사함
○ 생체기능성 나노입자의 발광 세기 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - Upconverting nanoparticle의 photo-luminescence 세기 증가 - 새로운 laser excitation scheme을 통한 발광 검출감도 증가 	<ul style="list-style-type: none"> - Upconverting nanoparticle ($\text{NaYF}_4/\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)의 결정구조를 cubic phase로부터 hexagonal phase로 변화시켜 발광 세기를 10배 가량 증가시킴 - High power CW 980 nm laser를 single-mode optical fiber와 연결하여 gaussian beam profile과 high laser power를 동시에 구현하여 upconverting nanoparticle의 발광세기 및 검출 감도를 증가시킴

○ 나노입자의 in vivo (세포) 나노발광 연구	- 살아있는 세포와 upconverting nanoparticle의 상호작용연구	<ul style="list-style-type: none"> - 현미경용 live cell imaging chamber(2차년도 기자재 구입 품목)를 신규 구매, 설치하여 살아있는 세포의 장시간동안 연속적인 이미징을 가능하게 함 - 살아있는 HeLa cell 내에 endocytosis된 upconverting nanoparticle의 시간에 따른 분포 변화, 이동 경로 등을 나노형광(발광) 이미징을 통해 조사함
------------------------------	--	--

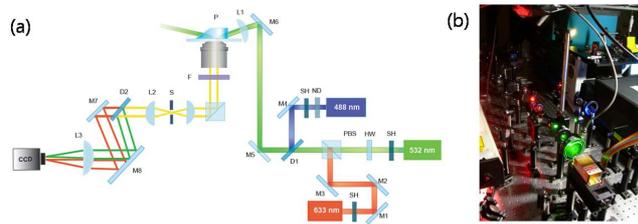
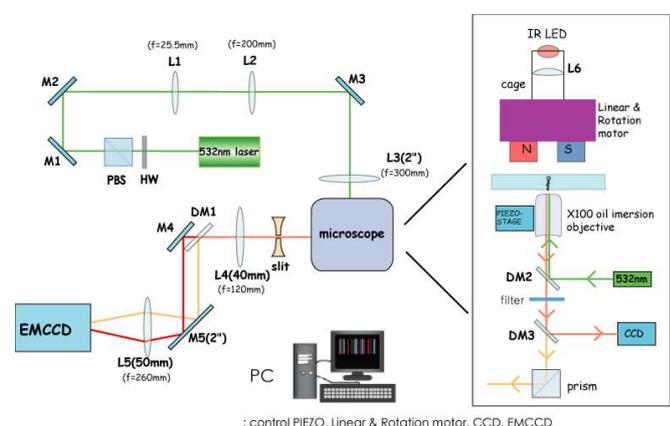
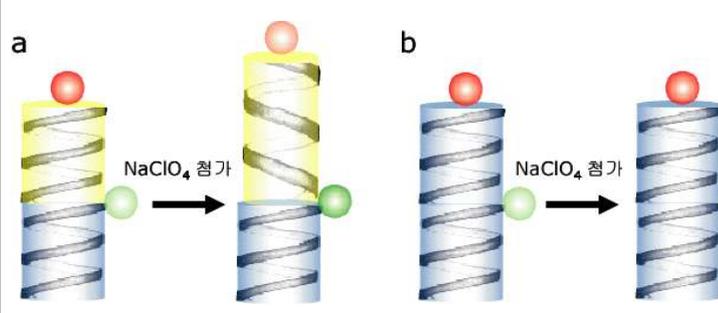
3. 3차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
○ 살아있는 세포 내 나노입자 이동 궤적 추적	- 실시간 이미징 및 단일입자 추적 분석 (single-particle tracking)	- 살아있는 세포 내로 진입한 나노입자(UCNP)의 이동 경로를 실시간 이미징을 통해 관찰하고 단일입자 추적을 통해 분석함
○ 살아있는 세포 내 나노입자의 분포에 대한 실시간 연구	- 세포와 나노입자의 결합 시스템에 대한 안정적인 장시간 이미징 수행	- 살아있는 세포 내로 진입한 나노입자의 장시간에 걸친 분포 변화를 추적하여 intracellular pathway를 규명함
○ 나노입자를 이용한 세포기관 및 분자의 타게팅(targeting) 연구	- 나노입자에 암표적 및 치료 물질인 Ce6를 결합하여 암세포에 결합시켜 관찰	- 암에 걸린 동물(실험용 쥐)에 나노입자(UCNP)-Ce6 결합체를 주입하여 암세포에 타게팅이 되는 정도를 이미징을 통해 확인

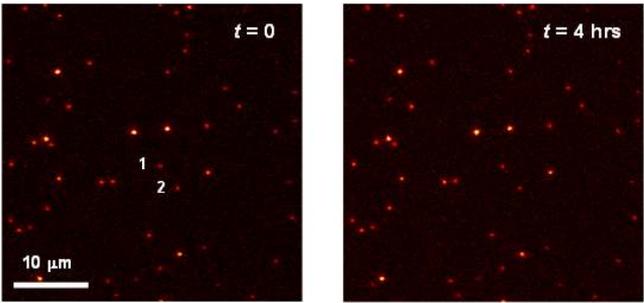
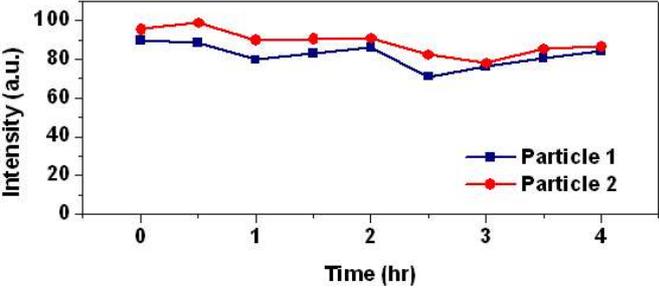
제2절 연구수행 내용 및 결과

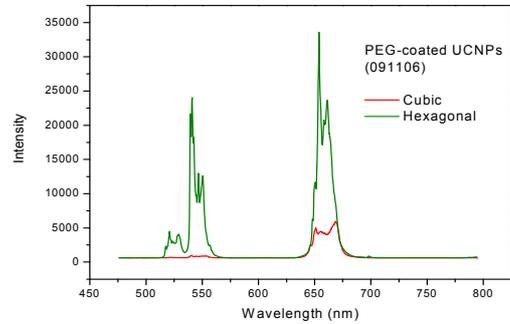
1. 1차년도

연구 내용	연구 결과
나노형광분광장치 제작 및 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 유기염료(organic dye), 발광 나노입자(luminescent nanoparticle) 등의 단일분자/단일입자 수준의 형광 검출 및 대면적 이미지 획득함 - in vitro 혹은 in vivo 시스템에 대한 bright field 와 형광(발광) 이미지를 동일한 영역에 대하여 획득함
나노형광 분광 장치의 <i>in vitro</i> 시스템에 대한 적용	<ul style="list-style-type: none"> - 근적외선(near IR)을 흡수하여 가시광선(visible)을 방출하는 발광 나노입자 (upconverting nanoparticle, UCNP)을 in vitro, 단일입자 수준에서 이미징을 함 - 나노입자(UCNP 등)의 단일입자 수준의 광학적 성질, 즉 photoblinking, photobleaching 등에 대한 정량적인 결과를 얻었음 - UCNP를 세포에 internalize시킨 후 세포 및 UCNP의 복합이미지를 획득하여 새로운 세포이미지용 나노프로브로서의 가능성을 명확히 밝힘 - 2009년 3월 미국 보스턴에서 열린 53rd Biophysical Society Annual Meeting에서 본 연구와 관련하여 발표함 - 2009년 4월 서울 COEX에서 열린 대한화학회 103회 춘계총회에서 "Physical Chemistry for Biological Application"에서 초청 발표함 (invited talk)
EM-CCD를 이용한 단일분자 형광 이미징 장치 개발	<ul style="list-style-type: none"> - EMCCD를 이용한 단일분자 형광 이미징 장치를 개발함 - 3 color-FRET 실험을 수행할 수 있도록 최적화함

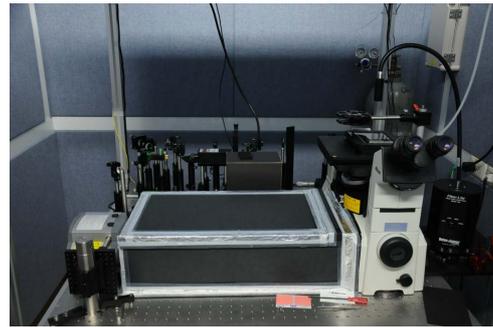
	
<p>Objective-type TIR 장치 개발</p>	 <p>: control PIEZO, Linear & Rotation motor, CCD, EMCCD</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prism-type TIRF 외에 objective-type TIRF 장비를 추가 개발함 - Magnetic tweezers 장비와 결합함
<p>DNA 형광 labeling 방법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - DNA 시료의 형태 변화를 프로빙할 수 있도록 형광 dye labeling을 최적화함 

2. 2차년도

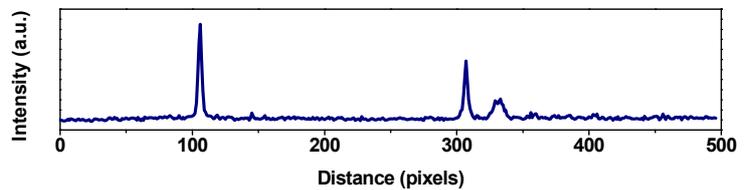
연구 내용	연구 결과
<p>○ 생체기능성 나노입자의 발광 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Upconverting nanoparticle을 위한 photo-luminescence (발광) spectrum 측정 장치 구축함 - 980 nm diode laser, mirror, monochromator, CCD camera로 구성됨 - 일반적인 fluorometer에서 측정이 불가능한 upconversion photo-luminescence를 수시로 측정하기 위해 신규 제작 및 설치함 - Photobleaching이 4 시간동안 0% 발생하여, exponential decay를 고려할 때 10시간 후에도 photobleaching이 전혀 일어나지 않음을 확인였고, upconverting nanoparticle이 연속적인 장시간 이미징에 적합함을 확인하였음. <div style="text-align: center;">   </div>
<p>○ 생체기능성 나노입자의 발광 세기 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Upconverting nanoparticle의 photo-luminescence 세기 증가 - 새로운 laser excitation scheme을 통한 발광 검출감도 증가 - Upconverting nanoparticle ($\text{NaYF}_4/\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)의 결정구조를 cubic phase로부터 hexagonal phase로 변화시켜 발광 세기를 5배 이상 증가시킴



- High power CW 980 laser를 single-mode optical fiber와 연결하여 gaussian beam profile과 high laser power를 동시에 구현하여 upconverting nanoparticle 의 발광세기 및 검출 감도를 증가시킴

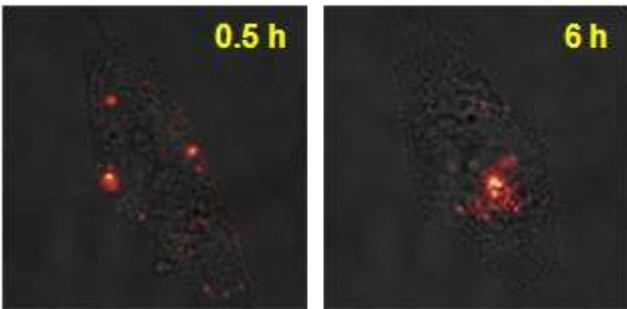


- 발광신호 S/N ratio > 20 달성함

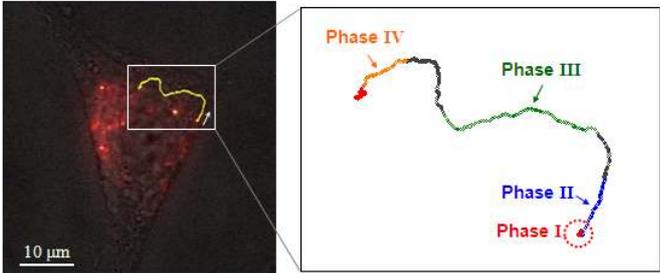
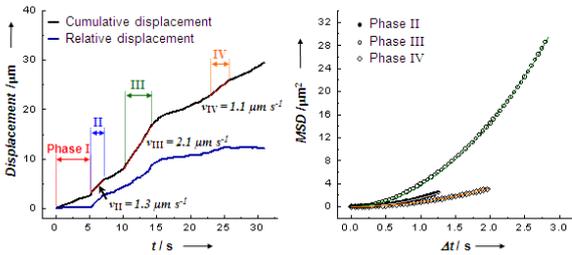


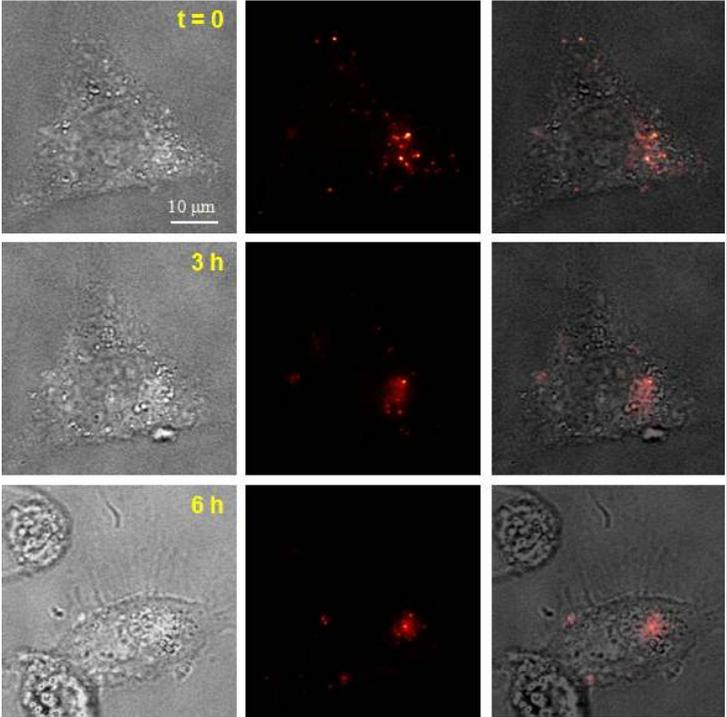
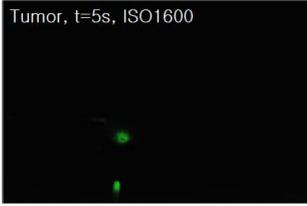
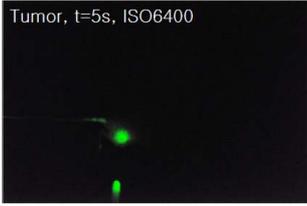
○ 나노입자의 in vivo (세포) 나노발광 연구

- 살아있는 세포와 upconverting nanoparticle의 상호작용연구

	<ul style="list-style-type: none"> - 현미경용 live cell imaging chamber(2차년도 기자재 구입 품목)를 신규 구매, 설치하여 살아있는 세포의 장시간 이미징을 가능하게 함 - 살아있는 HeLa cell 내에 endocytosis된 upconverting nanoparticle의 시간에 따른 분포 변화, 이동 경로 등을 나노형광(발광) 이미징을 통해 조사함 <div style="text-align: center;">  </div>
<p>○ 발표 실적</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 본 과제 수행 내용이 <u>Advanced Materials (Impact Factor : 8.191)에 발표됨</u> (2009년 11월) - 본 과제 수행 내용인 UCNP imaging 장비에 대한 <u>특허를 출원함</u> (2009년 11 월30일, 출원번호: 10-2009-0116648) - 2009년 5월 29일 제주도에서 개최된 <u>Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics</u>에서 <u>학술발표</u> (Invited talk) - 2009년 8월 일산 KINTEX에서 개최된 <u>나노코리아(Nano Korea)에서 학술 발표</u> (Invited talk) - 2009년 12월에 일본 오사카에서 개최된 <u>Watching Biomolecules in Action (WBMA 2009)</u>에서 <u>학술 발표</u> (Invited talk) - 그 외 성균관대학교, 아주대학교, 중앙대학교, KAIST 등에서 학술 발표 (Invited talk)

3. 3차년도

연구 내용	연구 결과
<p>살아있는 세포 내 나노입자 이동 궤적 추적</p>	<p>- 세포 내에 endocytosis를 통해 진입한 나노입자 (UCNP)들의 세포 내 이동 과정을 실시간으로 이미징 함</p>  <p>- 세포 내 나노입자의 이동 경로 (trajectory)를 분석하여 speed, MSD를 계산함</p>  <p>- 분석결과 나노입자의 transport가 주로 microtubule을 따라 움직이는 motor protein, 즉 dynein, kinesin에 의해 이루어지고 있음을 확인함</p>
<p>살아있는 세포 내 나노입자의 분포에 대한 실시간 연구</p>	<p>- 살아있는 HeLa cell에 endocytosis를 통해 진입한 UCNP의 분포를 6시간 연속적으로 이미징함</p>

	<div style="display: flex; justify-content: space-around; text-align: center;"> <div>Bright Field</div> <div>Luminescence</div> <div>Overlay</div> </div> 
<p>나노입자를 이용한 세포기관 및 분자의 타게팅(targeting) 연구</p>	<p>- UCNP와 암표적/암치료 물질인 Ce6의 결합나노입자를 실험용 쥐에 주입했을 때 암세포로 선택적으로 targeting됨을 확인함</p> <div style="display: flex; flex-wrap: wrap;"> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>Tumor, t=5s, ISO1600</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>Tumor, t=5s, ISO6400</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>Tumor, t=5s, ISO1600</p> </div> <div style="width: 50%; text-align: center;">  <p>Tumor, t=5s, ISO6400</p> </div> </div>

<p>발표실적</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 본 과제 수행 내용이 <u>Angew. Chem. Int. Ed.</u> (Impact Factor : 11.829)에 게재 승인됨(2011년 3월) - 2011년 4월 29일 제주도에서 개최된 대한화학회 총회 심포지엄 초청 발표 - 2010년 11월 9-12일에 싱가포르 국립대학에서 개최된 Actin, the Cytoskeleton, and the Nucleus 학회에서 발표 - 그 외 POSTECH, 고려대학교에서 초청 발표
-------------	--

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발목표의 달성도

1. 1차년도

목 표	달 성 도(%)	내 용
○ 나노형광분광장치 제작 및 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 유기염료(organic dye), 발광 나노입자 (luminescent nanoparticle) 등의 단일분자/단일입자 수준의 형광 검출 및 대면적 이미지 획득함 - in vitro 혹은 in vivo 시스템에 대한 bright field와 형광(발광) 이미지를 동일한 영역에 대하여 획득함
○ 나노형광 분광 장치의 <i>in vitro</i> 시스템에 대한 적용	100	<ul style="list-style-type: none"> - 근적외선(near IR)을 흡수하여 가시광선(visible)을 방출하는 발광 나노입자(upconverting nanoparticle, UCNP)을 in vitro, 단일입자 수준에서 이미징을 함 - 나노입자(UCNP 등)의 단일입자 수준의 광학적 성질, 즉 photoblinking, photobleaching 등에 대한 정량적인 결과를 얻었음 - UCNP를 세포에 internalize시킨 후 세포 및 UCNP의 복합이미지를 획득하여 새로운 세포이미지용 나노프로브로서의 가능성을 명확히 밝힘

2. 2차년도

목 표	달 성 도(%)	내 용
○ 생체기능성 나노입자의 발광 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> - Photobleaching time > 10 hr - 4 hr 측정 후 0% photobleaching 결과를 얻었음 - Photobleaching의 decay를 exponential로 가정할 경우 위의 결과(0% after 4 hr)로부터 lifetime > 10 hr임을 확인할 수 있음
○ 생체기능성 나노입자의 발광 세기 최적화 : 신호대잡음비	100	<ul style="list-style-type: none"> - 발광 이미지상에서의 S/N ratio > 20 달성
○ 나노입자의 in vivo (세포) 나노발광 연구 : 나노입자와 세포와의 상호작용 정량 분석 정확도	100	<ul style="list-style-type: none"> - 나노입자와 세포와의 상호작용 시간에 따른 나노입자 양의 분석이 이미지 상에서 가능함

3. 3차년도

목 표	달 성 도(%)	내 용
○ 살아있는 세포 내 나노입자 이동 궤적 추적	100	<ul style="list-style-type: none"> - 공간위치정확도 < 50 nm (~3 nm 달성) - 시간분해능 : 50 ms
○ 살아있는 세포 내 나노입자의 분포에 대한 실시간 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> - 실시간 세포이미징 시간 > 4 hr (6 hr 달성)
○ 나노입자를 이용한 세포기관 및 분자의 타게팅 (targeting) 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> - 동물 암세포 targeting 달성

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 추가연구의 필요성

1. 살아있는 세포 내 나노입자의 long-term distribution 변화 연구

가. Intracellular trafficking pathway

- (1) 24시간 이상의 time scale에서 나노입자(UCNP)의 분포가 변화하는 양상을 snapshot 이미징으로 측정하여 intracellular trafficking의 전과정을 관찰하는 추가적 연구가 필요함
- (2) 특히 세포 밖으로 나노입자가 배출되는 exocytosis가 일어나는지의 여부는 매우 중요한 문제로 장시간 이미징을 통해 이를 확인할 수 있을 것임

나. Inhibition studies

- (1) Exocytosis를 확인하기 위해서는 나노입자의 신호가 감소하는 것을 측정함과 동시에 각종 inhibitor drug/enzyme을 사용한 control 실험이 필수적으로 추가 수행되어야 함
- (2) 한편 세포 밖으로 배출되어 culture media 상에 존재하는 나노입자의 농도변화를 시간에 따라 측정하는 실험 또한 병행되어야 함

2. 나노입자를 이용한 암세포 치료 연구

가. 다양한 표적 방식(targeting scheme)의 개발

- (1) UCNP의 독특한 광학적 특성(근적외선 흡수/가시광선 발광)을 이용하여 drug release 혹은 photodynamic therapy (PDT) 효과를 볼 수 있는가에 대한 관심이 집중되고 있음
- (2) 이를 위해 다양하고 효율이 높은 표적 방식의 연구개발이 필요함

나. 세포 및 동물 실험의 병행

- (1) 세포와 동물에서의 암세포 표적 효율 및 치료효율이 다를 수 있으므로 두 시스템에 대한 실험이 병행되어야 함
- (2) 전자의 경우 본 과제를 통해 개발된 나노형광분광법이 핵심적인 연구 기술이 될 것임

제2절 타연구에의 응용

1. 세포 다이내믹스 연구

- 가. 분자생물학 분야에서는 형광체가 부착된 분자들 개개의 dynamics를 관측할 수 있게 해줌으로써 분자 수준의 생물 현상에 대해 더욱 깊은 이해를 가능케 할 것이며,

이와 더불어 세포 안에서 무슨 일이 일어나는지에 관한 새로운 연구 분야를 만들게 될 것임

나. 본 연구결과물인 나노형광분광 장비를 이용한 단일 생분자의 기능분석기술은 나노스케일의 살아있는 세포의 영상 구현 기술로, 세포막 단백질 채널 이송현상 및 세포체 성분의 실시간 다이나믹스 연구가 가능할 것임

2. 암세포 치료 연구

가. 본 연구과제를 통해 개발되는 측정 및 분석 기술은 암세포 치료 과정에 대한 실시간 모니터링을 가능하게 할 것임

나. 세포 치료 과정의 모니터링을 통해 규명된 생물리학적 기작은 세포 치료 기술의 최적화에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 예상됨

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 나노입자와 세포의 상호작용 연구 관련 정보

1. 나노입자를 이용한 live cell, animal imaging 및 치료 연구
 - 가. 세포 내에서 photobleaching이 일어나지 않는 upconverting nanoparticle을 이용한 암세포 표적 연구 [7]
 - 나. siRNA 전달 과정 추적 [8]
 - 다. Upconverting nanoparticle을 이용한 photodynamic therapy (PDT) 연구 [9]
2. 탄소나노튜브 및 나노다이아몬드를 이용한 live cell 연구
 - 가. 탄소나노튜브의 intracellular pathway에 대한 연구 [10]
 - 나. 나노다이아몬드의 intracellular pathway에 대한 연구 [11]

제2절 세포 내 나노입자 다이내믹스 연구 관련 정보

1. HeLa cell에서 일어나는 양자점의 endocytosis와 exocytosis 과정 연구 [12]
2. 탄소나노튜브의 endocytosis와 exocytosis 과정 연구 [13]

제7장 참고문헌

- [1] A. Yildiz *et al.*, *Science* **300**, 2061, **2003**
- [2] Sua Myong *et al.*, *Nature* **437**, 1321, **2005**
- [3] Stefan W. Hell, *Science* **316**, 1153, **2007**
- [4] C. L. Evans *et al.*, *Optics Express* **15**, 12076, **2007**
- [5] Y. I. Park *et al.*, *Adv. Mater.* **21**, 4467, **2009**
- [6] S. H. Nam *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press, **2011**
- [7] Meng Wang *et al.*, *ACS Nano* **3**, 1580, **2009**
- [8] Shan Jiang *et al.*, *Nanotechnology* **20**, 155101, **2009**
- [9] Baris Ungun *et al.*, *Opt. Express* **17**, 80, **2009**
- [10] Hong Jin *et al.*, *ACS Nano* **3**, 149, **2009**
- [11] Bailin Zhang *et al.*, *Small* **5**, 2716, **2009**
- [12] Xiue Jiang *et al.*, *ACS Nano* **4**, 6787, **2010**
- [13] Hong Jin *et al.*, *Nano Lett.* **8**, 1577, **2008**

평가의견 수정·보완 요구사항	평가의견 수정·보완 조치사항	비고(해당 Page)
○ 해당사항 없음	○ 해당사항 없음	