

단분자 프렛을 이용한 생물 분자의 연구

홍성철 · 하택집

머리말

살아있다는 것과 죽었다는 것의 구분은 과학 교육을 전혀 받지 않은 어린아이들도 할 수 있는 가장 명백하면서도 쉬운 일 중의 하나이다. 이러한 구분은 너무도 명백해서 불과 백 여년 전만 하더라도 이 우주에 존재하는 전혀 다른 두 세계, 즉 생물과 무생물은 서로 자기만의 법칙에 따라서 움직인다는 생기론이 널리 받아들여지고 있었다. 하지만 지난 세기 동안 다른 과학 분야와 마찬가지로 생명 현상에 대한 이해도 눈부시게 발전했다. 백 여년이라는 짧은 기간에 과학자들은 유전 현상의 근본에 DNA가 존재한다는 것과 또 유전 정보가 DNA 속에 어떻게 저장되고 발현되는지 그리고 어떤 메커니즘을 통해서 다음 세대로 전달되는지를 밝혀냈다. 우리가 외부 세계를 느끼고 생각하고 반응하는 데는 신경 세포가 필요하고 이들이 어떻게 작용하는지도 많이 알게 되었다. 생명 현상의 근본이 되는 수많은 생화학 반응들이 발견되었고 많은 질병들, 특히 암 세포의 발생과 진행 메커니즘을 이해하기 시작했다. 우리는 생명 현상의 근본에는 무생물의 세계와 정확히 똑같은 물리와 화학 법칙을 따르는 생물 분자들이 존재한다는 것을 알게 되었고 생명 현상을 이해하기 위해서는 그것이 아무리 복잡하고 신기하다 하더라도 그 현상에 참여하는 생물 분자들 사이의 상호 작용을 물리 화학적으로 이해해야 한다는 결론에 도달하게 되었다.

생명 현상을 분자 단위에서 이해하는 일은 매력적이고 이번 세기에 우리 과학자들이 수행해야 할 임무 중의 하나이지

저자약력

홍성철 박사는 2000년 서울대학교에서 물리학 박사 학위를 받았다. 서울대학교에서 2년간 일한 후 2002년에 하택집 교수 연구실의 일원이 되어 생물물리 연구를 하고 있다. (shohng@uiuc.edu)

하택집 교수는 1996년 UC Berkeley에서 물리학 박사 학위를 받았다. 로렌스 버클리 국립 연구소와 스탠포드 대학교에서 박사후 연구과정을 거친 후 2000년부터 어바나-샴페인에 있는 일리노이 대학교의 물리학과와 생물물리학과 교수로 일하고 있다. 그 동안 받은 수상 경력으로는 2001년 Searle scholar, 2002년 NSF CAREER award, 2003년 Sloan fellowship, 2003년 Cottrell scholar가 있고 최근에는 하워드 휴즈 연구자로 선정되었다. (tjha@uiuc.edu)

만 매우 어려운 일이라는 것 또한 사실이다. 자연 조건 속에서 대부분의 생물 분자들은 모양을 끊임 없이 바꾸고, 분자들 사이의 상호작용 또한 여러 단계를 거쳐서 매우 복잡하게 일어나기 때문에 변화무쌍한 생물 분자들의 세계를 이해하기 위해서는 아주 새로운 실험 방법이 요구된다. 기존의 고 분해능 X-레이 결정법이나 NMR 분광학 등은 생물분자의 구조에 대한 귀중한 정보들을 제공하지만 다양한 분자들 사이에서 일어나는 동적인 생화학적 현상을 정량적으로 이해하는 데는 어려움이 많다. 이런 점에서 단분자 분광학이 많은 관심을 끌고 있다. 생물 분자들을 자연 상태에서 관측할 수 있다는 기존 분광학의 장점을 그대로 지니면서 생물 분자 하나 하나의 운동을 실시간으로 관찰할 수 있기 때문에 복잡하고 역동적인 생물분자들의 움직임과 작동과정을 연구하는데 적합하기 때문이다. 여러 가지 단분자 분광학 기술 중에서도 특히 단분자 프렛은 나노미터 이하의 분해능으로 생물 분자들의 모양 변화와 상호 작용을 측정할 수 있기 때문에 가장 인기가 있고 잠재력이 있는 측정 기술이다. 이 글에서는 우리 실험실에서 해온 일들을 바탕으로 단분자 프렛 실험의 원리와 실제 실험 방법, 그리고 생물 분자 연구에 응용된 예를 들고 앞으로의 발전 방향에 대해 논하고자 한다.

단분자 프렛 분광학이란?

1. 프렛(Fluorescence Resonance Energy Transfer)의 원리

프렛은 두 개의 형광 분자 사이에 짧은 거리에서 일어나는 에너지 이동 현상을 말한다.^[1] 에너지를 주는 분자를 주개(donor), 에너지를 받는 분자를 받개(acceptor)라고 부르는데 그림 1(a)에 주개 분자와 받개 분자의 에너지 준위가 그려져 있다. 보통 받개 분자의 흡수 에너지 준위가 주개 분자의 방출 빛띠와 겹쳐지도록 선택되는데 이러한 경우에 그림에서 보이듯이 주개 분자가 흡수한 에너지는 이중극자 상호작용을

참고문헌

[1] T. Forster, Ann. Phys. 2, 55 (1948).

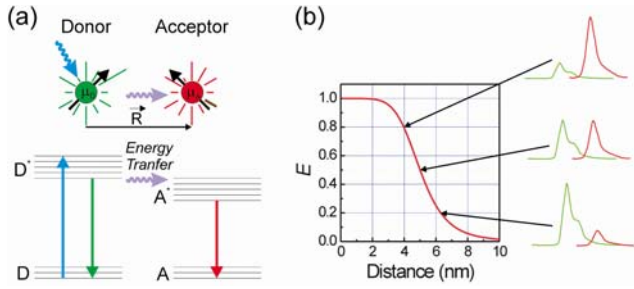


그림 1. 프렛의 원리 (a) 주개 분자와 받게 분자의 에너지 준위 (b) 거리에 따른 프렛 효율.

통해서 받게 분자로 전달될 수 있다. 이 상호작용의 해밀토니안은 아래와 같이 표현되는데

$$H = \frac{\vec{\mu}_D \cdot \vec{\mu}_A - 3(\vec{\mu}_D \cdot \hat{R})(\vec{\mu}_A \cdot \hat{R})}{R^3}$$

여기서 $\vec{\mu}_D$, $\vec{\mu}_A$ 는 각각 주개와 받게 분자의 전이 이중극자 모멘트, 그리고 \hat{R} 은 두 분자를 잇는 벡터다. 페르미 황금률을 이용하여 전이율 k_t 를 아래와 같이 구할 수 있다.

$$k_t \propto \langle D^*, A | \frac{\vec{\mu}_D \cdot \vec{\mu}_A - 3(\vec{\mu}_D \cdot \hat{R})(\vec{\mu}_A \cdot \hat{R})}{R^3} | D, A^* \rangle^2$$

여기서 초기 상태는 주개 분자의 들뜸 상태 $\langle D^* |$ 와 받게 분자의 바닥 상태 $\langle A |$ 의 곱이고 최종 상태는 주개 분자의 바닥 상태 $| D \rangle$ 와 받게 분자의 들뜸 상태 $| A^* \rangle$ 의 곱이다. 즉, 프렛에 의한 전이율은 주개와 받게 분자 사이 거리 R 의 육승에 반비례하게 됨을 알 수 있다. 따라서 프렛 효율 E , 즉 주개에 흡수된 에너지 중 받게 분자로 전이되는 비율은, 주개 분자의 radiative decay rate를 k_r , nonradiative decay rate를 k_{nr} 라 할 때 아래와 같이 표현된다.

$$E = \frac{k_t}{k_t + k_r + k_{nr}} = \frac{1}{1 + (k_r + k_{nr})/k_t} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

여기서 R_0 는 50 %의 주개 분자에 흡수된 에너지가 프렛 현상을 통해서 받게 분자로 전이되는 거리를 말하는데 이 값은 주개 분자와 받게 분자의 광학적 성질과 공간적 배치에 따라 결정된다. 보통 R_0 는 3 ~ 7 나노미터 정도이다. 예를 들어 R_0 가 5 나노미터인 경우의 프렛 효율을 거리 R 의 함수로 그림 1(b)에 그렸다. 눈여겨 볼 점은 프렛효율이 2 ~ 8 나노미터 사이에서 급격하게 변하는 것을 알 수 있다. 이를 이용하면 프렛을 나노미터 이하의 분해능을 가진 거리 측정 수단으로 쓸 수 있다. 대부분의 생물 분자들의 크기가 수 나노미터에서 십여 나노미터 영역에 있다는 것을 생각하면 왜 프렛이 생물 분자 연구에 활발히 이용되는지 쉽게 이해할 수 있다.

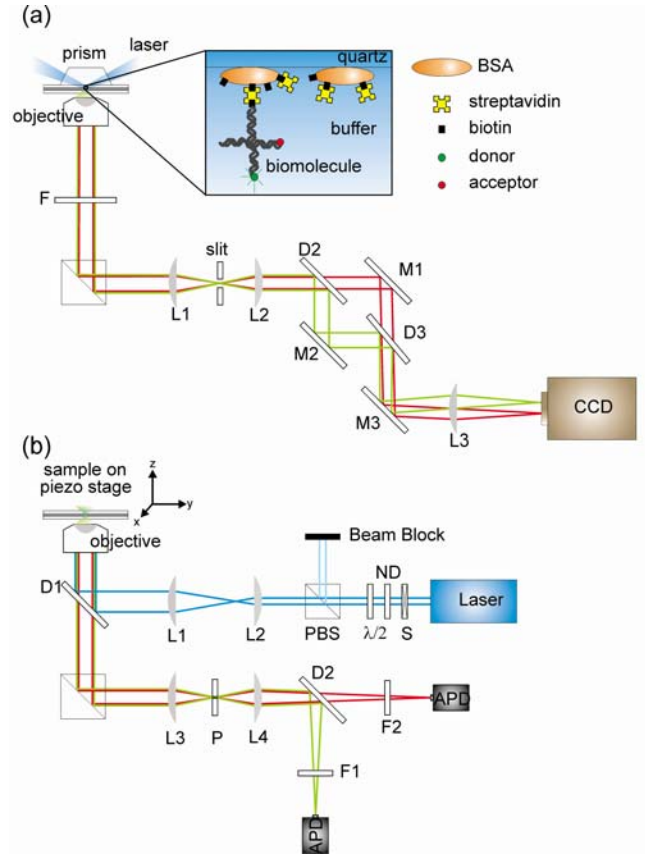


그림 2. 단분자 프렛을 위한 실험 장치 (a) CCD 카메라를 이용한 장치 (b) 사태광다이오드를 이용한 장치.

2. 단분자 프렛 실험의 실제

프렛을 이용해서 생물 분자를 연구하기 위해서는 주개 분자와 받게 분자를 필요한 곳에 붙여야 한다. 이를 위해서는 형광 분자를 붙이고 싶은 위치를 반응성이 강한 작용기로 바꾸고 각각의 작용기와 선택적으로 결합하는 형광 분자를 반응시키는 방법을 주로 쓴다. DNA나 RNA의 경우는 아민 (-NH₂) 작용기가 주로 쓰이고 단백질의 경우는 파이올 (-SH) 작용기를 이용하는 방법이 많이 쓰인다.

이렇게 준비된 생물 분자들은 프렛 효율의 평균값만을 줄 수 있는 기존의 앙상블 측정 방법으로 연구할 수도 있지만 단분자 분광학을 이용하면 훨씬 많은 정보를 얻을 수 있다. 첫째로, 단분자 분광학은 분자의 여러 가지 존재 상태를 구별하고 각각의 분포 확률을 얻을 수 있다. 둘째로, 단분자 분광학은 실시간으로 분자의 상태를 따라갈 수 있기 때문에 생물 분자가 각 상태들 사이를 얼마나 자주 옮겨가는지를 분석할 수 있다. 하지만 분자 하나에서 나오는 빛은 아주 약하기 때문에 측정 효율을 최대한 높여야 한다. 이를 위해서 조리개수가 큰 현미경 렌즈와 양자거둠울이 좋은 측정기는 필수적이다. 실험에 사용되는 측정기의 종류에 따라서 단분자 프렛 실험 장치는 크게 두 가지로 구분될 수 있다.

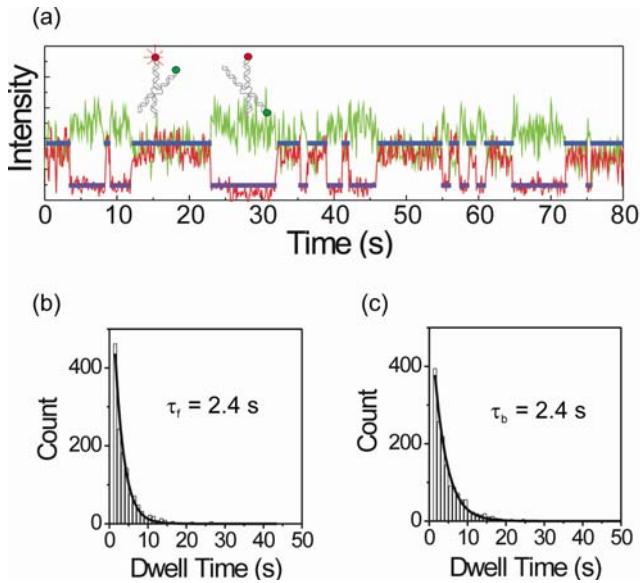


그림 3. 실제 단분자 프렛 데이터의 예 (a) RNA 분자를 이용해서 얻은 단분자 프렛 데이터 (b) (c) 높은 프렛 상태와 낮은 프렛 상태 사이의 전이를 측정하기 위한 히스토그램.

그림 2(a)에 CCD 카메라를 이용하는 방법이 보여져 있다. 형광 분자가 붙여진 생물 분자는 장시간 측정을 위해서 수정 슬라이드 표면에 고정되어야 한다. 그림에는 가장 많이 쓰이는 고정 방법 중의 하나인 스트랩타비딘과 바이오틴을 이용한 방법이 보여져 있다. 전반사 방법을 사용해서 형광 분자들을 들뜬 상태로 만들면 배경 잡음을 크게 줄일 수 있다. 현미경으로 모은 형광 신호는 이색 거울을 이용해서 분리되고 CCD 카메라의 서로 다른 영역에 모아지게 된다. CCD를 이용한 측정법은 수백개의 생물 분자들의 움직임을 동시에 관측할 수 있다는 장점이 있는 대신 시간 분해능이 10 ms 정도로 제한되어 있다. 이와 비교해서 사태 광다이오드를 측정기로 사용하는 방법(그림 2(b))은 분자 하나 하나를 순차적으로 관측해야 하기 때문에 실험 시간이 많이 걸리고 실시간으로 변하는 실험 조건에서 실험하기가 어렵다는 단점이 있는 반면에 마이크로초의 시간 분해능을 얻을 수 있다는 장점이 있다. 따라서 두 측정 방법은 상호 보완적인 면이 있다.

단분자 프렛 실험을 보다 피부로 느낄 수 있게 실제 실험의 예를 그림 3에 들어 보았다. 이 실험에는 네 개의 팔을 가진 RNA 분자가 사용되었다. 그림 3(a)에 보여지듯이 RNA 분자의 모양이 변함에 따라서 주개 분자 (연두색 동그라미)와 받개 분자 (빨간색 동그라미)의 상대적 밝기가 변함을 알 수 있다. 그림 3(b)와 3(c)에 보이듯이 RNA 분자가 각 상태에 머무르는 시간을 모아서 히스토그램을 만들면 RNA 분자가 두 상태 사이를 얼마나 빠르게 오가는지를 알 수 있다. 이러한 전이 확률이 다양한 온도나 금속 이온의 농도에서 어떻게 달라지는지 연구하면 RNA 모양 형성 메커니즘을 알아낼 수 있다.

3. 단분자 프렛의 응용분야

단분자 프렛은 1996년에 처음 선보인 이후에^[2] 선도적인 몇몇 연구자들에 의해서 다양한 생물 분자 연구에 사용되어 왔다. 지면 관계상 몇 가지 대표적인 최근의 예만을 말하면, RNA 효소의 모양 형성 메커니즘의 연구,^[3] 헬리케이스에 의한 DNA 풀림의 연구,^[4] 라이보솜의 단백질 합성 메커니즘의 연구,^[5] 단백질 모양 형성 메커니즘^[6]의 연구 등이 있다. 이제 단분자 프렛 기술은 어느 정도 잘 정립되었고 점점 더 많은 사람들이 생물학 문제를 풀기 위해서 뛰어들고 있기 때문에 앞으로 단분자 프렛의 생물학 연구에 응용된 예는 빠른 속도로 늘어날 것으로 기대된다.

최근의 기술 발전 상황 및 앞으로의 발전 방향

단분자 프렛 기술은 지난 십 여년간 지속적으로 발전되어 왔다. 하지만 이 측정 기술이 보다 광범위한 문제에 이용되기 위해서는 몇 가지 개선되어야 할 점들이 있다. 여기서는 지난 몇 년간에 일어난 대표적인 기술 발전 상황을 되짚어 보고 가능하다면 앞으로의 발전 방향에 대해 말해보고자 한다.

1. 새로운 형광 입자의 사용

현재 단분자 프렛에서 주개 분자나 받개 분자로 쓰이는 형광체는 유기 염료이다. 하지만 유기 염료는 광표백 현상이 심하기 때문에 긴 관측 시간을 요하는 실험이나 높은 배경 잡음이 있는 환경에서는 쓰이기 어렵다. 대체물로 반도체 나노 입자와 금속 나노 입자가 생각되어지고 있다. 특히 반도체 나노 입자는 유기 염료에 비해서 매우 밝기 때문에 살아있는 세포와 같이 배경 잡음이 심각한 조건에서 큰 장점이 있다. 하지만 이들이 실용화되기 위해서는 몇 가지 해결되어야 할 문제들이 있다. 반도체 나노 입자의 경우는 심한 깜박거림 현상 때문에 단분자 분광학에 사용하기에 어려움이 있다. 최근에 이러한 깜박거림을 효과적으로 줄일 수 있는 방법이 발견되었고^[7] 반도체 나노 입자와 유기 염료사이의 단분자 프렛이 생물분자 연구에 이용이 가능하다는 것이 증명되는 등 많은

참고문헌

- [2] T. Ha *et al.*, "Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 624 (1996).
- [3] X. Zhaung *et al.*, *Science* **296**, 1473 (2002).
- [4] T. Ha *et al.*, *Nature* **419**, 638 (2002).
- [5] S.C. Blanchard *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **10**, 1008 (2004).
- [6] E.A. Lipman *et al.*, *Science* **301**, 1233 (2003).
- [7] S. Hohng and T. Ha, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 1324 (2004).

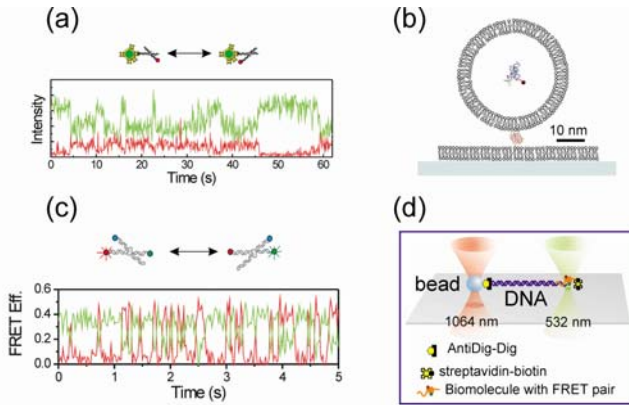


그림 4. 최근의 기술 발전 사항들 (a) 반도체 나노 입자를 이용한 단분자 프렛 실험 (b) 지방질 구를 이용한 새로운 표면 고정 기술 (c) 삼색 단분자 프렛 실험 (d) 광학 집게와 단분자 프렛의 결합을 위한 개념도.

발전이 있었지만 나노 입자를 생물 분자에 붙이는 과정에서 나노 입자의 크기가 너무 커지고 따라서 프렛 효율이 너무 낮게 된다는 문제가 동시에 발견되었다.^[8] (그림 4(a)). 이 기술이 실용화되기 위해서 작은 크기의 반도체 나노 입자를 키워내고 생물 분자에 붙이는 방법의 개발이 기대된다. 금속 나노 입자의 경우는 아직 시작 단계에 있다고 할 수 있다.

2. 새로운 표면 고정 방법

앞에서 말했듯이 생물 분자의 움직임을 오랫동안 관측하기 위해서는 분자들을 슬라이드 표면에 고정할 필요가 있다. 핵산의 경우는 그림 2(a)에 보여진 스트렙타비딘-바이오틴을 이용한 고정 방법이 잘 작동하지만 단백질의 연구에는 이러한 방법이 문제가 있다는 것이 알려졌다. 이런 경우에 표면 고정 에 의한 좌위적인 결과를 근본적으로 없애는 방법으로 제시된 것이 생물 분자를 광학적 분해능보다 작은 지방질 구속에 가두고 그 구를 슬라이드 표면에 붙이는 방법이다 (그림 4(b)). 이러한 방법으로 고정된 RNA 효소의 움직임이 단분자 프렛을 이용하여 성공적으로 관측되었는데^[9] 이 기술은 앞으로 다양한 단백질 분자들을 연구하는 데 쓰일 수 있을 것이다.

3. 다색 프렛

기존의 단분자 프렛에는 하나의 프렛 쌍이 사용되어져 왔다. 하지만 이러한 이색 프렛 방법은 연구 대상이 되는 분자의 크기가 커지고 복잡해지면 분자 전체의 움직임을 이해하

참고문헌

- [8] S. Hohng and T. Ha, *ChemPhysChem* **6**, 956 (2005).
- [9] B. Okumus *et al.*, *Biophys. J.* **87**, 2798 (2004).
- [10] S. Hohng *et al.*, *Biophys. J.* **87**, 1328 (2004).
- [11] M. Lang *et al.*, *Nat. Methods* **1**, 133 (2004).

는데 한계가 있다. 이런 점에서 하나의 주개 분자와 두 개의 서로 구별되는 반개 분자를 이용한 삼색 프렛 연구는 흥미롭다고 할 수 있겠다.^[10] (그림 4(c)). 최근에는 두 개의 서로 다른 프렛 쌍을 이용하려는 사색 프렛 연구도 진행되고 있다.

4. 광학 집게(optical tweezers) 혹은 자기 집게(magnetic tweezers)와 결합하려는 노력

광학 집게와 자기 집게는 단분자를 피코뉴턴 이하의 정밀도로 제어할 수 있는 기술이다. 이 정도의 힘은 생물 분자의 동역학 연구에 적합한 양이다. 한편, 단분자 프렛은 나노미터 이하의 정밀도로 생물 분자의 움직임을 측정할 수 있는 기술이다. 두 기술이 결합함으로써 그 동안 불가능했던 다양한 연구가 가능하다.^[11] (그림 4(d)). 예를 들어 RNA 분자의 접힘 과정의 이해는 지난 몇 년간 중요 연구 주제였는데 새로운 장치를 이용하면 RNA 접힘의 활성화 상태에 대한 연구가 가능해질 것이다. 이외에도 단백질의 모양 형성 과정이나 생물 분자들 사이의 상호작용의 연구에 광범위하게 쓰일 것으로 기대된다.

맺는말

현재 대부분의 물리학과 교육은 물리학자들이 무생물만을 연구해야 하고 또 혹 생명 현상에 관심이 있더라도 큰 기여를 할 수 없을 것이라는 인식을 학생들에게 심어주기 쉽게 짜여져 있다. 하지만 물리학이든 생물학이든 하는 구분은 인간이 만든 것일 뿐 자연은 학문을 구분하지 않는다. 우리가 풀려는 문제가 생명 현상과 같이 복잡해지고 어려워지면 다양한 각도의 접근과 공동의 노력이 점점 더 요구되는데 지난 세기에 일어난 분자 생물학의 발전이 이를 증명해 주고 있다. 분자 생물학의 발전에는 수많은 물리학자들이 알게 모르게 기여를 해왔다. 몇 가지 예만 들더라도 보어와 슈레딩거가 양자역학의 법칙을 발견한 이후에 많은 젊은 물리학자들이 이로부터 생명 현상에 관한 영감을 얻게 되었다. 프란시스 크릭은 직접 DNA의 구조를 밝혀내는 일에 참여하였고 델브룩은 페이지 그룹으로 활동하면서 유전 메커니즘을 규명하는데 선도적 역할을 하였다. 이 외에도 엑스-레이와 NMR, 그리고 주사 현미경 등 물리학자들에 의해서 만들어진 측정 장치들이 생물학 발전에 끼친 영향은 매우 크다. 인간의 유전자 지도가 만들어진 오늘날에는 많은 분야의 과학자들이 생명 현상을 완벽하게 이해하려는 일에 동참하고 있다. 하지만 생명 현상이 신비한 만큼 생명 현상을 완벽하게 이해하는 것은 지극히 어려운 일이 될 것이다. 우리는 지난 세기에 그랬듯이 이러한 노력에 물리학자들이 많은 기여를 할 것을 믿어 의심치 않는다. 젊은 우리의 글이 그를 위한 작은 계기가 되었으면 하는 바램이다.