단일분자 형광 분광학

DOI: 10.3938/PhiT.22.051

이 광 록

Single-molecule Fluorescence Spectroscopy

Gwangrog LEE

Recent progress in single-molecule fluorescence spectroscopy has made very accurate measurements of molecular interactions at the nanometer scale possible. This has revolutionized the way biological processes are investigated and has provided many new aspects of not only the kinetics of molecular interactions but also their underlying mechanisms, leading to new insight into the biochemical reactions in biological systems. In this report, we introduce recent technical progress and new findings that have improved our understanding of the operating principles of dynamic motor proteins in biological systems. Watching one molecule at a time by using simple fluorescent detection opens new doors to a bright future for biological physics, which should contribute to modern biology.

서 론

생명체를 이루는 최소단위인 세포는 소우주로 비교될 수 있다. 우주의 별들이 규칙을 가지고 운행을 하듯이 세포라는 소우주에도 많은 “분자별”들이 생명체의 질서 속에서 운행하고 있다는 점에서 우주와 매우 비슷하다. 우주에서는 각각의 별들은 상당히 떨어져 운행하지만 소우주인 세포에서는 수많은 분자들이 매우 가깝게 존재하고 매우 복잡하게 상호작용한다는

점이 차이점이라고 할 수 있다.

천문학 연구도 별들을 관찰함으로써 시작되었듯이 대부분의 연구가 관찰에 의존한다. “Seeing is Believing”이라는 말처럼 직접 볼 수 있다는 것은 매우 강력한 연구기법(research tool)이다. 어두운 밤하늘에 떠있는 별들의 움직임을 관찰하기 위해 망원경이 개발되었고, X-선 망원경, 적외선 우주망원경, 허블 우주망원경 등의 발전과 더불어 천문학이 비약적으로 발전되었듯이 21세기 생명과학도 형광체(fluorophore)의 개발과 현미경 기술의 발전으로 제2의 생명과학 르네상스시대를 맞이하고 있다. 이러한 흐름 속에 단일분자 형광분광학(single molecule spectroscopy)이 급속도로 발전하고 있다. 단일분자 형광분광학은 생체분자를 형광체로 표식(labeling)하여 분자 하나하나를 직접 관측함으로써 분자들의 상호작용 메커니즘을 이해하려는 생물물리학적 연구방법이다.

다채로운 형광색은 어둡고 분자들로 자욱한 세포 내에서 원하는 분자만을 선택적으로 볼 수 있게 해주기 때문에 비로소 세포 내 분자 움직임을 연구할 수 있게 해준다. 하지만 형광으로 표식된 분자들은 빛의 회절한계(diffraction limit)로 인해 대략 250 나노미터(nano-meter)의 공간 분해능(spatial resolution) 제한(limit)을 가지고 있다. 생명체에서 일어나는 물리화학적 반응(reaction)은 공간적으로 수십 나노미터 범위 내에서 일어난다. 특히 생물학적 반응을 촉진시키는 효소(enzyme)들의 작동은 수 나노미터 이내에서 일어나기 때문에 빛을 이용하여 이를 관찰하기는 쉽지 않았었다. 특히 많은 분자들이 끊임없이 움직이는 세포 내에서 단일 형광체의 움직임을 관찰하는 것은 어려운 일이었다.

최근 20여 년 동안 필수 요소만으로 재구성된 세포막(*In-vitro*) 실험에서는 수많은 연구결과들이 양산되고 있고 그 중심에는 단일분자 프렛(FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer)^[1]과 단일입자 추적(single particle tracking)^[2]이 있

저자약력

이광록 교수는 2006년 Duke 대학 기계재료공학부에서 원자현미경을 이용한 단일분자 탄생연구로 박사 학위를 받았으며, 일리노이 대학교(UIUC) 물리학 과에서 박사후 연구원으로 단일분자 동력학을 연구하였다. 2012년부터 광주과학기술원 생명과학부에 재직 중이며 현재 단일분자 형광 분광학을 이용하여 여러 종류의 효소기능들을 연구를 하고 있다. (gwangrog.lee@gmail.com)

REFERENCES

- [1] T. Ha, *Methods* **25**, 78 (2001).
- [2] M. J. Saxton and K. Jacobson, in *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **26**, 373 (1997).

Fig. 1. Distance-resolution range of various single molecule fluorescence techniques.

다. 이러한 형광기법은 나노미터 수준의 움직임을 측정할 수 있다는 장점이 있다. 4 나노미터 미만의 민감도를 가지고 있는 형광강화(Fluorescence enhancement by PIFE)^[3]와 약화(Fluorescence quenching: FQ)^[4] 관찰기술, 3에서 8 나노미터 사이의 정확성을 가진 단일분자 프렛기법, 그리고 10 나노미터 이상의 움직임을 관찰할 수 있는 단일입자 형광 추적기법은 분자들의 상호작용 연구에 유용하다(그림 1). 이 지면에서는 위에서 언급한 3가지 방법과 단일분자 풀다운 기법(single molecule pull-down assay)^[5]을 소개하고 현재의 한계와 앞으로 발전방향을 가늠하며 이 글을 끝맺으려 한다.

단일분자 프렛

단일분자 분광학기술 중 가장 대표적이고 강력한 기술이 단일분자 프렛(single molecule FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer)이다. 이 기술은 단일분자 측정의 장점과 프렛현상의 장점을 접목시킨 기술이다. 단일분자 측정법은 앙상블 측정(ensemble measurement)에서 오는 이종성(heterogeneity)의 합체효과(averaging effect)를 피할 수 있고 같은 종류의 시그널만을 골라 분석할 수 있다는 장점이 있어 많은 동적 시스템에 사용되고 있다. 프렛은 1948년 독일 과학자인 Theodor Förster^[6]에 의해 발견되어 생명과학 및 여러 분야에 오랫동안 사용되어 왔지만 앙상블 합체효과 때문에 정량적이지 못했지만 단일분자 측정과 결합되어 더욱 더 정확하고 정량적 측정법으로 거듭났다.

프렛의 원리는 두 개의 형광분자 사이의 거리가 충분히 가까워져 쌍극자-쌍극자 결합(coupling)이 되면 형광과장이 짧은 도너(donor)에서 과장이 긴 엑셉터(acceptor)로 에너지가 전달되는 현상을 말한다.^[7] 프렛이 발생하는데 필요한 조건은 도너의 방출(emission) 스펙트럼과 엑셉터의 흥분(excitation) 스펙트럼이 중첩이 되어야 한다(그림 2(a)). 이때 에너지의 전달되는 정도는 프렛효율(FRET efficiency: E)로 나타내는데 이는 도너에서 엑셉터로 에너지가 전달되는지의 비율로 나타내고 0

Fig. 2. (a) FRET takes place when the emission spectrum of the donor overlaps with the excitation spectrum of the acceptor (gray shadow). (b) FRET efficiency(E) as a function of the distance(R) between the donor and acceptor.^[7] At $R=R_0$, $E=0.5$, where the relation between E and R is almost linear. FRET efficiency can thus be used as a spectroscopic ruler. (c) Single molecule FRET is an excellent tool to study inter- (left) and intra-molecular interaction (right).

에서 1 사이의 값을 갖는다(그림 2(b)).

프렛효율 E 는 그림 2(b) 하단의 수식처럼 표현되는데, 여기서 R 은 도너와 엑셉터 사이의 거리이고 R_0 는 E 가 0.5가 되는 R 값이다. 실험적으로 R 값은 측정하기가 쉽지 않아 수식으로 E 를 구하기 힘들다. 다행히도 프렛효율은 $E=I_D/(I_D+I_A)$ 로 근사될 수 있다. I_D 와 I_A 는 도너와 엑셉터의 밝기강도(intensity)이다. 따라서 두 형광체의 밝기만을 측정함으로써 거리변화를 쉽게 측정할 수 있다. 이 프렛효율을 두 형광체의 거리의 함수로 나타내면 그림 2(b)에서 보여지듯이 프렛효율이 ~0.5 근처에서 거리와 선형관계를 가지고 있어 프렛효율의 변화를 거리변화로 해석할 수 있는 편리함이 있다.

단일분자 프렛의 민감도는 3–8 나노미터로 분자간(inter-molecular: 그림 2(c) 왼쪽) 또는 분자 내(intra-molecular: 그림 2(c) 오른쪽) 상호작용을 연구하는 데 매우 유용하다. 최근 10년 동안은 단일분자 프렛기술은 DNA, RNA, helicase, polymerase, nuclease, ribosome 등의 단순시스템에서 복제(replication), 전사(transcription), 번역(translation), RNA 가공

REFERENCES

- [3] H. Hwang, H. Kim and S. Myong, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**, 7414 (2011).
- [4] R. Zhou, S. Kunzelmann, M. R. Webb and T. Ha, Nano Letters **11**, 5482 (2011).
- [5] A. Jain, *et al.*, Nature **473**, 484 (2011).
- [6] T. Förster, Discussions of the Faraday Society **27**, 7 (1959).
- [7] R. Roy, S. Hohng and T. Ha, Nature Methods **5**, 507 (2008).

(splicing) 등의 복합체 상호작용시스템으로 그 적용범위를 넓혀가고 있다. 하지만 3차원적으로 움직이는 생물학적 과정들을 2차원적 단분자 2색 프렛으로 측정하는 데는 한계가 많아 3색,^[8] 4색^[9] 프렛의 방법이 개발되었다. 3색 프렛 이상의 방법들은 더 많은 시공간적 정보를 주지만 실험이 어렵고 분석이 복잡해 연구자의 적절한 판단과 선택이 요구되어진다.

형광강화 & 형광약화 현상을 이용한 기술

단일분자 프렛은 강력한 측정기술이지만 대체적으로 3 나노미터 미만의 근접장의 상호작용을 연구하기에는 민감도가 떨어져 유용하지 못하다. 따라서 이를 극복할 수 있는 방법으로 형광강화(fluorescence enhancement)와 형광약화(fluorescence quenching) 현상을 이용한 상호작용 측정기술이 있다. 형광체가 가지는 광물리학적 효과(photo-physics effect)로 형광체의 주변 환경의 변화에 따라 밝기가 증감하기 때문에 3 나노미터 미만의 거리변화를 측정할 수 있다. 형광강화현상은 형광으로 라벨된 DNA나 RNA에 단백질이 결합하게 되면 형광체의 양자생산양(quantum yield)이 증가되는데 이를 PIFE(Protein Induced Fluorescence Enhancement)^[3]라고 부른다(그림 3(a)). 이 현상을 이용하게 되면 단백질이 언제 기질(substrate)에 결합하는지 알 수 있어 핵산-단백질 상호작용 연구에 많이 사용된다(그림 3(a) 하단).^[10] 최근 연구에 의하면 PIFE의 민감도는 0.5에서 4 나노미터로 단일분자 프렛으로 측정하기 어려운 짧은 근접장 상호작용 연구를 위한 보완적 방법으로 사용될 수 있다(그림 3(b)). 형광약화 현상은 형광체가 단백질 내부의 마이크로 환경 속에 있을 때 켄칭(quenching)되어 형광체의 양자생산양이 적게 나오다가 내부 환경이 변화함에 따라 양자생산양이 증가하는 현상을 말한다. 이를 이용하면 단백질의 접힘(folding)과 풀림(unfolding) 현상 또는 단백질 내부의 형태변화(conformational change)를 관찰할 수 있다. 그림 3(c)에서는 단백질의 형태변화에 따라 형광 신호가 on과 off로 발생하여 그 신호를 분석하면 단백질 형태변화의 다이내믹스를 연구한 예이다.^[4]

단일입자 형광 추적

세포에는 여러 모터(Motor) 단백질이 존재하는데, 이 모터 단백질들은 ATP(Adenosine triphosphate) 같은 화학연료를 소모하며 세포 내 불규칙적인 Brownian motion을 정류(rectification)화하여 일정한 방향으로 이동한다. 모터단백질들은 여러 종류의 자신만의 트랙(track) 위에서 움직이게 되며 필요한 반응(reaction)들을 촉매(catalysis)하여 많은 생물학적 과정(process)

Fig. 3. (a, top) Protein-Induced Fluorescence Enhancement (PIFE)^[3] occurs when an unlabeled protein binds to the fluorescently labeled DNA and RNA duplex. (a, bottom) Representative PIFE trace. (b) Comparison of distance sensitivity for PIFE vs FRET. (c) Exemplary intensity time traces showing two-state conformational dynamics originated from fluorescence quenching and de-quenching cycles.^[4]

등을 돕는다. 대표적인 예로 myosins, kinesin, dynein, F_0F_1 -ATP synthase, helicase, DNA polymerase, RNA polymerase, nuclease, topoisomerase 등이 있다. 생물물리학자들은 실시간으로 이들을 관찰하여 화학적 연료의 소비와 움직임의 관계를 연구함으로써 모터단백질의 작동 기전(mechanism)을 연구한다. 이러한 모터단백질들은 수 마이크로미터를 움직이기 때문에 3-8 나노미터의 민감도를 가진 단일분자 프렛 방법으로 연구하기에는 한계가 있다.

마이크로미터의 긴 움직임을 관찰할 수 있는 방법이 단일입자 형광 추적(Single Particle Fluorescence Tracking) 기술이다. 이 방법은 단순히 형광입자의 움직임을 시공간적으로 추적

REFERENCES

- [8] S. Hohng, C. Joo and T. Ha, *Biophysical Journal* **87**, 1328 (2004).
- [9] J. Lee, *et al.*, *Angewandte Chemie - International Edition* **49**, 9922 (2010).
- [10] G. Lee, J. Yoo, B. J. Leslie and T. Ha, *Nature Chemical Biology* **7**, 367 (2011).

Fig. 4. (a, top) Experimental schematic that allows fluorescence tracking for a quantum dot-labeled EcoP15I nuclease with helicase like domains. (a, bottom) Kymographs of the nuclease, diffusing for the target sites on the DNA in one dimensional search.^[11] (b) Gaussian fitting of photons distribution obtained from a single fluorescence dye.^[12] (c) Stepping traces of three different motor proteins (myosin V) with 74-nm steps, suggesting the hand-over-hand mechanism.^[12]

하는 것이다. 그림 4(a)는 최근에 사이언스지에 발표된 연구결과로 nuclease(DNA 자르는 효소)와 ATPase(ATP를 사용하여 움직이는 효소) 기능을 가진 단일효소가 어떻게 DNA track 위에서 자신이 잘라야 하는 사이트(site)를 인지하는지에 대한 연구이다.^[11] 그림 4(b) 하단에서 보듯이 모터단백질이 타겟 인지 사이트(중간 흰색 수평선)에 결합하여 ATP를 가수분해하면 모터단백질 내의 구조가 바뀌면서 DNA상에서 1D(1-dimensional) 움직임을 한다는 것을 밝혀냈다. 이 연구에서 위치정보의 정확성은 빛의 회절한계인 250 나노미터 수준이다. 하지만 수 나노미터의 기본걸음(basic step)을 가지고 움직이는 모터 단백질을 연구한다면 단순 단일입자 추적으로 기본걸음을 관찰하기 쉽지 않다. 이를 극복할 수 있는 방법이 피오나(FIONA: Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy)^[12]이다. 이 방법은 단일 형광체에서 나오는 빛은 회절현상 때문에 그림 4(b)의 봉우리 바닥면처럼 넓게 보이지만 단일 형광체에서 나오는 광자 수가 충분하다면 이를 가우시안(Gaussian)으로 피팅(fitting)함으로써 형광체가 존재하는 중앙의 위치를 수 나노미터의 정확성을 가지고 결정할 수 있다는 방법론이다. 이때 위치정확성은 형광체에서 얻어진 광자수에 의존하고 대략 100개의 광자를 얻는다면 23 나노미터 정도의 분해능을 가지고 10,000개의

Fig. 5. (a) Single Molecule Pull-down(SiMPull).^[16] The labeled proteins extracted from cell lysate are pull-downed onto the specific antibodies surface of the microscope slide, and are directly imaged by single molecule fluorescence microscope. (b) Co-localization assay using two different color proteins.^[5] (c) Various schemes of SiMPull are shown and their photo-bleaching analysis would disclose the stoichiometric composition.^[5]

광자를 얻는다면 2 나노미터 정확성을 얻을 수 있다.^[13] 2005년 일리노이 대학 Selvin 그룹이 이 방법을 사용하여 myosin과 kinesin이 74 나노미터를 엇갈려 걷는 핸드오버핸드(hand over hand) 형식으로 사람처럼 걷는다는 것을 밝혔다(그림 4(c)).^[12]

단일분자 풀다운 기법

앞에서 소개한 3가지 방법은 분자 움직임을 관찰할 때 쓰이며 주로 정제된 단백질을 사용한다. 세포에서 추출된 단백질 복합체는 정제과정 동안 분리되거나 원래의 상태를 잃는다. 따라서 얼마나 빨리 실험을 하느냐는 실험성공에 중요하다. 단일분자 풀다운(single molecule pulldown)^[5] 기법은 세포를 깨고 (lysis) 빠른 시간 내에 실험할 수 있어 원래상태의 단백질체 동적거동을 측정할 수 있다(그림 5(a)). 또한 세포를 깨는 과정 동안 실시간으로 형광체를 단백질에 표식할 수 있어 세포와 비슷한 *ex-vivo* 상태에서 실험을 할 수 있다는 장점이 있다. 게다가 세포 내에서는 단백질들이 여러 가지 행태로 변형

REFERENCES

- [11] F. W. Schwarz, *et al.*, Science **340**, 353 (2013).
- [12] A. Yildiz *et al.*, Science **300**, 2061 (2003).
- [13] H. Kim and T. Ha, Reports on Progress in Physics **76**(1) (2013).

(posttranslational modification)되는데 이러한 단백질변형의 기능을 연구할 수도 있다.

단일분자 풀다운 기법은 또한 여러 형광색을 사용하여 두 단백질이 직접 결합하고 있음을 형광색깔의 공존(co-localization)을 보임으로써 입증할 수 있다(그림 5(b)). 특히 세포 신호 통로(cellular signaling pathway)와 같은 연구분야에서는 상호작용하는 단백질복합체의 구성요소와 구성율(stoichiometry)을 밝히는 것이 기능 연구에 중요한데 이러한 연구에 단일분자 풀다운 기법이 사용될 수 있다(그림 5(c)). 이 방법과 질량 분석법이 결합하게 되면 앞으로 단백질 상호작용의 인터랙토姆(interactome)을 시각화하는데 많은 공헌을 할 수 있어 생명과학에 많은 공헌을 할 것이라고 생각된다.

맺는말

최근 20년 동안 단일분자 형광 분광학은 눈부신 발전을 했고 생명과학에 많은 공헌을 했으나 이제까지의 연구들은 실제 세포에서 측정된 것이 아니거나 제한된 단백질만을 사용한 세포밖(*in-vitro*) 실험들에 국한되었다. 향후 발전방향은 세포를 모방한 모든 반응복합체(full reaction complex)의 상호작용을 연

구하거나 살아있는 세포에서 분자들의 상호작용을 연구하는 방향으로 발전할 것이다. 최근 초고해상도(superresolution) 현미경인 STORM(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)^[14]과 STED(Stimulated emission depletion)^[15] 현미경이 발달하여 세포내에서 단일분자의 관찰을 가능케 해주어 더 많은 연구에 사용될 것이다. 세포에서 단일분자 이미징을 위해서는 새로운 형광체 개발도 요구된다. 어두운 세포 내에서 단일분자의 움직임을 관찰하려면 시그널 대비 노이즈 비율이 높아야 한다. 현재의 양자점(quantum dots)은 10-20 나노미터로 커서 생물학적 반응을 방해할 수 있기 때문에 작고 광자생산율이 높으며 수명이 긴 퀀텀닷 개발이 필요하다. 위에서 언급한 것들이 현재 활발히 개발되고 있어 단일분자 형광 분광법의 미래는 밝다.

REFERENCES

- [14] M. J. Rust, M. Bates and X. Zhuang, Nature Methods **3**, 793 (2006).
- [15] S. W. Hell and J. Wichmann, Optics Letters **19**, 780 (1994); K. I. Willig, *et al.*, Nature **440**, 935 (2006).
- [16] P. Tinnefeld, Nature **473**, 461 (2011).