단분자 집게기술을 이용한 생명 시스템의 물리적 이해

DOI: 10.3938/PhiT.25.053

최현규·김현우·나상현·윤태영

Understanding of the Physics of Biological Systems through the Use of Single-Molecule Magnetic Tweezers

Hyunkyu CHOI, Hyunwoo KIM, Sang-Hyun RAH and Tae-Young YOON

Single-molecule magnetic tweezers allow application of a piconewton-scale tension to single biological molecules. Observations of the behaviors of the single-molecules permit a determination of the kinetic rates for transitions between different states, which leads to construction of the free energy landscape governing the process. The behaviors observed under mechanical tension are typically different from those observed while executing Brownian motion free of mechanical tension. These observations collectively provide an avenue for understanding biological processes of interest from a physical viewpoint.

들어가는 글

생물물리학(biophysics) 분야에서 단분자 집게기술(single-molecule tweezers)은 단일 생체 분자에 세밀하게 조절되어진

저자약력

최현규 학생은 KAIST 물리학과(2015) 학부과정을 거쳐, 현재 KAIST 물리학과 대학원에 재학 중이다.

김현우 학생은 가톨릭대학교 물리학과(2014) 학부과정을 거쳐, 현재 KAIST 물리학과 대학원에 재학 중이다.

나상현 학생은 KAIST 바이오및뇌공학과(2012) 학부과정을 거쳐, 현재 KAIST 물리학과 대학원에 재학 중이다.

윤태영 교수는 서울대학교 공학박사(2004)로서, 어바나-삼페인 일리노이 주립대학과 하워드 휴즈 의학연구소 연구원을 거쳐, 2007년부터 카이스트 물리학과에 재직 후, 2016년 3월부터는 연세대학교 Yonsei-IBS Institute에 교수로 재직 중이다. (tyoon@yonsei.ac.kr)

외력을 가하는 방법이다. 단분자 집게 기술은 자기집게(magnetic tweezers), 광학 집게(optical tweezers) 그리고 원자력 분광기(atomic force spectroscopy, AFM)가 쓰인다. 원자력 분광기의 경우, 매우 작은 크기($\sim$ 수 μm)의 팁(tip)을 이용하여 생체 분자에 부착시켜 기계적으로(mechanical) 힘을 가하는 기술이다. 자기집게의 경우, 자성입자를 생체분자에 부착하고 외부 자기장의 기울기를 이용하여 자기력(magnetic force)을 가할 수 있다. 마지막으로, 광학 집게의 경우, 입자에 쏘이는 레이저의 세기에 기울기를 주거나 레이저의 모양을 대칭적인 곡선 형태로 변형시켜서 전기장의 기울기를 만들고 그로 인하여 비드에 전기력(electric force)을 가하는 방식이다.

이러한 단분자 집게 기술을 이용하면, 특정 단일 분자에 특정한 힘을 원하는 크기와 시간만큼 가할 수 있다.^[1] 외력을 통하여, 생체분자의 실시간(real-time) 반응(response)을 관찰하고 그 정보들에서 물리적으로 유의미한 신호를 뽑아냄으로써 생체 분자의 물리적 특성을 알아 볼 수 있다. 실제로, 특정 단백질을 관찰함으로써 접힘상태와 풀림상태에서의 반응속도 상수(kinetic rate)를 구할 수도 있고 이 반응 속도 상수를 통하여 단백질이 갖고 있는 고유의 자유에너지(Gibbs free energy)를 구할 수도 있다. 이러한 '물리량'을 얻어 냄으로써 단백질의 물리적 특징을 알아보고 주변 환경과의 상호작용 또한 어떠한 물리적 요인을 갖고 진행되는지 알아볼 수 있을 것이다.

이러한 관점에서 생물물리학은 기존 생물학 혹은 기존 물리학과는 다른 새로운 시각을 제시해줄 수 있는데, 생체 시스템을 물리적 시각으로 본다는 것이 정확한 표현일 것이다. 앞으로 소개할 4개의 연구는 바로 그러한 시각에서 바라본 유의미한 연구이며, 이러한 연구들을 통하여 생물물리학의 중요성 또한 한 번 더 강조될 것이다.

앞서 소개될 2가지 연구는 자기집게와 광학집게 기술을 이용하여 생체분자들(단백질, DNA)에 힘을 가하고 결과적으로 접힘

REFERENCES

- [1] Keir C. Neuman, Timothee Lionnet and J-F. Allemand, Annu. Rev. Mater. Res. 37, 33 (2007).

및 폴림 현상의 관측 및 분석을 통하여 ‘물리량’(반응 속도 상수, 에너지 장벽)을 얻어낸다.^[2,3] 이렇게 얻어낸 물리량이 생화학적으로 구한 결과들과 유사한지를 확인해보고자 한다. 뒤에서 소개될 2가지 연구는 ‘생체모사’를 통하여 기존에 추측되었던 가설을 ‘증명’한 연구들을 소개할 것이다.^[4,5] 이러한 생물물리학 실험을 통하여 기존 생물학에서 추론되어 왔던 현상들의 직접적인 증명과 ‘물리적 의의’를 통하여 생체모사를 한 층 더 세밀히 이해하는 기회가 될 것이다.

자기 집계를 이용한 막 단백질의 접힘과 폴림현상 관찰 및 분석

생체막 단백질(membrane protein)은 전체 유전인자(gene)의 20 ~ 30%가 관여할 만큼 생체 내에서 중요한 역할을 한다.^[6] ‘막’ 단백질은 이중 지질막(lipid bilayer)에 존재하는 단백질로써, 고유의 3차원 구조를 통하여 생체 내에서 여러 가지 특정한 기능을 담당하고 있다. 현대 의학에서 이슈화되고 있는 암의 표적 치료 또한 절반 이상이 이러한 생체막 단백질을 타겟(target)으로 하기 때문에 이중 지질막 안에 존재하는 단백질을 연구하는 것은 여러 분야에 걸쳐 큰 의미를 갖고 있다고 말할 수 있다.

하지만, 현재까지의 단백질들의 폴림과 접힘(unfolding and folding) 연구들은 SDS와 같은 변성제(denaturant)를 사용하기 때문에 이중 지질막의 조성이 다 파괴되었고, 3차 구조에서 1차 구조로의 폴림 현상과 1차 구조에서 3차 구조로의 접힘 현상에서 또한 실시간으로 전이현상을 관측할 수 없었다.

이러한 문제점을 극복하기 위해 본 연구단은 단분자 기술(single-molecule technique) 중 자기집게(magnetic tweezers)를 이용하여 이중 지질막의 환경에서의 단백질의 접힘과 폴림 역학(dynamics)과 이중 지질막과의 상호작용까지 알아보았다. 자기집게 기술을 이용하면, 이중 지질막과 평행한 방향으로 힘을 가할 수 있을 뿐만 아니라, 접힘과 폴림 관찰에 있어서 지질막의 형태를 훼손시키지 않기 때문에 막 단백질 연구에 적격이라 말할 수 있다.

연구에 사용되었던 막 단백질은 롬보이드 단백질 계열(Rhomboid protein family)로 알려진 GlpG이다. GlpG는 이중 지질막에서 지질막에 존재하는 다른 단백질들의 구조를 잘라주는 단백질 분해효소로써 6개의 막 관통 나선(transmembrane helix)이 3차원 구조를 형성하고 있다.^[7]

그림 1은 자기집게를 이용하여 바이셀 환경에 존재하는 막 단백질인 GlpG가 어떠한 형식으로 힘을 받고 그 결과로써 GlpG가 풀리는지를 보여준다. 여기서 우리가 관측한 extension은 자성 비드의 PEG(polyethylene glycol) 표면으로의 상대적 높이이다. 기본적으로 폴림 실험은 힘의 점진적인 증가(force-ramp ex-

Fig. 1. (a) Schematics of unfolding experiment of GlpG in a bicelle using magnetic tweezers. (b) Representative force-extension curve of unfolding of GlpG.^[8]

periment)를 통하여 진행된다.^[9] 만약 단백질의 폴림이 있다면, (b)에서 보이는 것처럼 같은 힘-변위 그래프에서 연속적인 증가가 아닌 extension의 ‘jump’가 일어나게 된다. 512 base pair 길이의 DNA를 GlpG의 N 말단과 C 말단에 부착시킨 이유는 표면과의 비 특이적 상호작용을 막고 persistence length가 긴 DNA를 이용하여 단백질을 표면과 멀리 떨어뜨리기 위함이다. GlpG 아래쪽의 DNA는 biotin이 부착되어 있기에 PEG 표면에 있는 neutravidin과 붙으며, GlpG 위쪽의 DNA는 dig가 부착되어 있어서 anti-dig로 코팅된 자성비드에 붙게 된다. 이렇게 자기 집게를 이용한 단백질 연구의 실험 구성은 SDS와 같은 변성제가 없기 때문에, 지질막을 파괴하지 않고 생체환경을 더 직접적으로 묘사할 수 있다는 것이 큰 장점이다.

그림 1(b)에서 알 수 있듯이, 25 pN 근방에서 GlpG가 풀리는 것을 알 수 있는데, 바이셀이 존재하는 GlpG는 상당히 큰 힘에서 그 구조가 풀리는 강한 역학적 이력현상(large mechanical hysteresis)을 갖고 있다고 볼 수 있다. 이러한 강한 이력 현상은 6개의 막 관통 나선이 점차적으로 천천히 풀리는 것이 아니라, 높은 협동성(high cooperativity)을 갖고 한 번에 풀리거나 접히는 것을 암시한다.

REFERENCES

- [2] Duyoung Min, *et al.*, Nature Chem. Biol. **11**, 981 (2015).
- [3] K. Neupane, Daniel A. N. Foster and M. T. Woodside, Science **352**, 239 (2016).
- [4] X. Zhang *et al.*, Science **324**, 5932 (2009).
- [5] A. del Rio *et al.*, Science **323**, 5914 (2009).
- [6] A. Krogh, B. R. Larsson, G. Von Heijne and E. L. Sonnhammer, Journal of Molecular Biology. **305**, 567 (2001).
- [7] Y. C. Wang, Y. J. Zhang and Y. Ha, Nature **444**, 179 (2006).
- [8] Duyoung Min *et al.*, Nature Chem. Biol. **11**, 981 (2015).
- [9] Duyoung Min *et al.*, Nature Communications **4**, 1705 (2013).

Fig. 2. (a) Study of GlpG unfolding under different buffer conditions. (b) Representative force-extension curve of unfolding of GlpG under different buffer conditions.^[8]

그림 2는 자기집게와 바이셀을 사용한 목적이라고 할 수 있는 대표적인 실험이다. 단백질 실험의 큰 장점 중 하나는 한 개의 특정 단백질을 선택하여 그 단백질의 역학을 주변 환경을 (buffer 교환을 통하여) 변화하며 실시간으로 관찰할 수 있다는 것이다. (b)에서 알 수 있듯이, 바이셀이 없는 상황에서는 1차 구조로의 풀림 현상이 일어나는 힘이 5 pN 근방으로 급격히 낮아짐을 알 수 있는데, 이러한 결과는 물리적으로 GlpG라는 막 단백질의 안정성(stability)이 바이셀이 없는 상황에서 상당히 낮아졌음을 의미한다. 또한 강하게 나타났던 이력현상 또한 사라짐을 알 수 있는데, 막 단백질의 풀림 및 접힘 현상은 지질막의 존재 유무에 상당히 강한 의존성을 갖고 있으며 중요한 역할을 한다고 생각할 수 있다.

이러한 풀림 및 접힘 실험은 Kramer's theory에 의하여 접힘 및 풀림 속도 상수와 직접적으로 연관된다. 그리고 풀림과 접힘의 속도 상수의 비율은 에너지 장벽의 크기로 연결된다. 정량적인 에너지 풍경의 묘사를 위하여 그림 3(a)와 같이 풀림 실험을 무수히 하여 (b)의 그래프로써 풀림 비율을 힘에 따라 구한다. 이러한 분포는 물리적으로 풀림 속도 상수(unfolding kinetic rate)와 반응좌표계(reaction coordinate) 내에 존재하는 접힘상태(N)와 전이상태(transition state) 사이의 거리를 제공한다. 또한 접힘 속도 상수 그리고 풀림 상태(U)와 전이상태 사이의 거리를 구하기 위하여, (c)와 같이 특정 힘마다 특정시간을 기다리며 접힘이 되었는지를 확인하는 힘 순환 실험을 하였다. 그 결과로 (d)와 같이 접힘 비율을 힘에 따라 구할 수 있으며, 이 풀림 및 접힘 상수를 통하여 결과적으로 (e)와 같은 큰 에너지 장벽 또한 구할 수 있다. 풀림상태와 접힘상태의 에너지 차이(ΔG)는 6.5

Fig. 3. Folding energy landscape of GlpG. (a) Representative unfolding trace of GlpG. (b) Unfolding fraction versus force ($n=233$). (c) Representative refolding trace of GlpG at different force values. (d) Refolding fraction versus force ($n=125$). (e) Folding energy landscape of GlpG.^[8]

kbT로 전통적인 생화학 실험(bulk equilibrium unfolding experiment)의 결과인 ~ 7 kbT와 매우 유사함을 알 수 있었다.^[10] 또한 에너지 풍경을 통하여 에너지 장벽이 풀림상태보다 접힘상태에 더 가깝다는 사실을 통하여 에너지 곡물의 가파른 기울기가 막 단백질의 단단한 안정성(rigidity)을 보여줌을 알 수 있다.

광학집게를 이용한 생체 분자(DNA, 단백질)의 접힘과 풀림에 대한 실시간 관측 및 분석

직전에 소개한 본 연구단이 연구했던 막 단백질의 경우, 자기 집게를 이용하여 단백질의 풀림 및 접힘을 관찰하고 이를 통하여 풀림 및 접힘 속도 상수, 궁극적으로 에너지 풍경을 그려보았다. 하지만 본질적으로 단백질이 풀리거나 접히는 현상은 매우 짧은 범위 시간($10 \mu s \sim 0.1 ms$)에서 일어나기 때문에 직접적으로 관측하기 매우 어려우므로 실험의 전략을 바꾸어 풀림과 접힘 현상의 결과만을 이용하여(힘에 따른 접힘과 풀림의 비율) 각각의 반응속도 상수와 에너지 장벽의 크기를 구하였다고 볼 수 있다. 하지만, 생체분자(biomolecular)의 구조가 변하는 궤적을 실시간으로 관측하여 접힘-풀림의 동역학적(folding-unfolding dynamics)인 정보를 얻어낸다면 생체분

REFERENCES

[10] R. P. Baker and S. Urban, Nature Chem. Biol. **8**, 759 (2012).

Fig. 4. (a) scheme of protein transition path in the two state barrier. (b) A DNA handle attached DNA hairpin and dual trap optical force spectroscopy. (c) measured DNA hairpin extension. x_1 and x_2 is the boundary of transition path (d) highlight a transition path.^[13]

자의 구조 형태를 이해하는데 중요한 일이 될 것이다. 본 절에서 소개할 내용은 단분자 기술을 이용하여 생체분자 구조 변화(접힘 및 풀림)를 실시간으로 관측하여 물리적으로 유의미한 결과를 얻어낸 연구이다.^[11]

생체분자의 구조 전이 상태(conformational transition state)로 가는데 걸리는 시간은 일반적으로 마이크로초(μ s) 단위이기 때문에 전이 궤적(transition path)을 직접 관측하기 어려움이 있어왔다. 그렇기 때문에 지금까지는 간접적으로 동역학적 정보를 얻어내기 위하여 전이 궤적들을 직접 분석하는 대신, 접힘 상태와 풀림 상태 두 상태를 기점에 두고 전이 상태(transition state)가 존재한다고 생각하고 두 상태(접힘, 풀림 상태)에 존재할 확률을 측정하였고 동역학적 반응속도의 분석(kinetic analysis)을 사용하여 에너지 풍경(energy landscape)를 추정하는 방법을 사용해왔다.^[12]

하지만 최근에 단분자 힘 분광학 장비의 성능을 크게 개선하여 전이 궤적을 직접 관측하는 연구결과들이 나오고 있다.^[13-15] 특히, 광학 집게(optical tweezers)를 사용하여 전이 궤적을 측정하고 생체분자의 구조 변화에 대해 생물물리학적으로 이해하려는 최근 연구 결과에 대해 살펴보고자 한다.^[13,14]

생체분자의 전이 궤적은 복잡한 접힘 상태에서 풀림 상태로 전이하는 순간에 관측되기 때문에 전이 궤적이 측정되는 시간은 접힘-풀림 상태에 존재할 때보다 대략 1000배 정도 짧다. 일반적으로 에너지가 낮은 상태인 접힘 상태에 존재하려고 하기 때문에, 실험에서는 광학 집게를 사용하여 외력을 걸어 풀림 상태와 접힘 상태에 존재할 확률을 각각 50%로 만들고 두 상태에서 존재하는 시간이 동일하도록 만드는 것이 실험의 전략이라고 할 수 있다. DNA handle은 폴리머(polymer)의 특성을 가지고 있기 때문에 handle의 compliance를 고려하여 hairpin의 전이 궤적의 범위를 정해주었다.(그림 4 참조)

최근 연구결과에서는 30R50/T4 DNA hairpin에 대해 단분자 광학 집게 실험을 반복하여 수집한 풀림(그림 5 참조)의 전이 시간을 측정한 결과($27 \pm 2 \mu$ s)와 이전 연구결과에서 크래머의 식

Fig. 5. Collected heterogeneous transition paths with boundary (Cyan) (a) unfolding (b) refolding.^[13]

(Kramer's equation)을 사용하여 추정된 결과($30 \pm 6 \mu$ s)^[16]를 통해 측정과 이론이 잘 맞음을 확인했다. 또한 측정된 결과를 사용하여 구해진 확산 계수(diffusion coefficient) 또한 기존에 알려진 확산 계수와 유사한 것을 확인했다.^[13]

더 나아가, 모든 힘의 범위(대부분 접힘 상태인 낮은 힘, 대부분 풀림 상태인 높은 힘)에서 전이 시간의 평균이 모두 잘 맞는 것을 알 수 있다. 이 결과는 전이 시간에 대한 시간역전대칭(time-reversal symmetry)이 성립함을 보여준다. 또한 각각의 풀림현상과 접힘현상의 전이 시간 분포가 비슷함을 알 수 있는데, 이 역시 시간역전대칭을 증명해준다. 마지막으로 전이시간 분포의 모양이 지수함수의 긴 꼬리(long tail)를 갖고 있는데, 높은 에너지 장벽을 갖는 크라머스 영역으로부터 얻은 경향과 비슷한 것을 알 수 있다.^[17] 이러한 결과들을 통해 hairpin의 경우 1D 확산 모델(diffusion model)이 잘 맞다고 볼 수 있다.(그림 6 참조)

DNA hairpin은 생체분자의 접힘-풀림 상태를 모사할 수 있는 가장 간단한 모델이다. 그렇기 때문에 단순한 구조의 단백질에 한해서만 같은 접근법을 활용하여 단백질의 접힘-풀림 상태를 확인할 수 있다. 그림 7은 모델 시스템으로 프리온 단백질을 dimer 형태로 만들고 전이 궤적과 시간을 측정한 결과이다.^[13] 프리온 dimer의 경우 diffusion이 monomer에 비해 확산이 느리다고 알려져 있기 때문에 복잡한 구조를 가진 단백질에 대한 모델 시스템으로 적합하다.^[8] 그림 7에서 보이는 것처럼 DNA

REFERENCES

- [11] K. C. Neuman and A. Nagy, Nat. Methods 5, 491 (2008).
- [12] W. J. Greenleaf, M. T. Woodside, E. A. Abbondanzieri and S. M. Block, Phys. Rev. Lett. 95, 208102 (2005).
- [13] K. Neupane, Daniel A. N. Foster and M. T. Woodside, Science 352, 239 (2016).
- [14] K. Neupane, A. P. Manuel and M. T. Woodside, Nat. Phys. 12, 700 (2016).
- [15] G. Zoldak, H. Li and M. Rief, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 18156 (2013).
- [16] K. Neupane *et al.*, Phys. Rev. Lett. 109, 068102 (2012).
- [17] S. Chaudhury and D. E. Makarov, J. Chem. Phys. 133, 034118 (2010).

Fig. 6. The case of the DNA hairpin (a) average transit time from low force to high force. (b) The distribution of the transit times and fit by expected behavior for transit across harmonic barriers in the high-barrier limit in the Kramer's regime.^[13]

Fig. 7. The case of the dimeric prion protein (a) transit time and trajectory with boundary. (b) The distribution of transit times and fit by expected behavior for transit across harmonic barriers in the high-barrier limit in the Kramer's regime.^[13]

hairpin의 경우보다 전이 시간이 느리지만 (~0.5 ms), 1D로 근사된 크래머의 이론 모델과 잘 맞음을 확인할 수 있다. 이처럼 전이 시간을 직접 관측함으로써 기본적인 물리량 중 하나인 확산 계수를 직접적으로 구할 수 있고, 단백질들을 측정된 전이 시간에 따라 분류할 수 있다.

지금까지 설명한 생체분자들은 측정된 전이 시간을 1D로 근사된 크래머의 이론으로 설명되었다. 하지만 구조가 복잡한 단백질의 경우, 한 방향을 축으로 잡은 반응 좌표계(reaction coordinate)가 맞지 않기 때문에 근사된 이론으로는 설명이 불가능하다. 이러한 경우를 분류하기 위해 간단한 단백질인 루이신 지퍼(leucine zipper)의 전이 궤도와 시간을 측정하여 1D 확산 모델로 근사한 연구결과가 있다.^[14]

프리온 단백질의 경우에 조건부 확률을 이용하여 길이(extension)가 늘어났을 때 전이 궤적을 추적하면, 에너지 장벽 근처에서 길이에 따른 전이 궤적의 확률분포를 얻을 수 있다.^[19] 그림 8에서 보이는 것처럼, 사전 연구 결과를 통해 계산된 1D 에너지 풍경에 잘 부합하는 것으로 보아 1D 확산 모델로 잘 설명됨을 알 수 있다. 이에 반해, 그림 9에서 보이는 것처럼 중간 상태가 존재하는 루이신 지퍼의 경우, 존재할 조건부 확률을 통해 얻어진 전이 궤적 분포와 1D 에너지 풍경과 잘 맞지 않는 것을 확인할 수

Fig. 8. Transition path analysis of prion protein. (a) Conditional probability analysis and fitted by 1D diffusion model. (b) Calculated folding probability from energy landscape.^[14]

Fig. 9. Transition path analysis of leucine zipper (a) protein unfolding-refolding trajectory with boundary. (b) Conditional probability analysis and fitted by 1D diffusion model.^[14]

있다. 이러한 결과를 통해 단백질의 복잡도가 올라갈수록 1D 확산 모델로의 근사가 잘 맞지 않는다는 것을 알 수 있다.^[14]

지금까지 전이 궤적과 시간을 직접 관측함으로써, 물리학적 모델로 분석이 가능해지고 관측된 물리량을 통해 모델의 근사가 얼마나 효과적으로 맞는지 확인했다. 이러한 결과 분석을 통해 측정할 생체분자의 다차원 성을 확인하고 효과적인 반응 좌표를 선택하여 단백질의 생물물리학적 정보를 얻는 연구에 활용할 수 있다.

단분자 힘 분광학은 생체 분자에 특정한 힘을 가하여 그 반응 및 현상을 관찰하고 분석하는 도구이다. 지금까지 소개한 연구는 단백질의 접힘 및 풀림현상 관찰과 '물리량'이라 볼 수 있는 접힘 및 풀림속도상수 그리고 에너지 장벽의 크기를 구하는 방법에 대해서 설명했다면, 본 절에서 소개할 연구는 생체 분자에 힘을 가할 수 있는 단분자 기술을 이용하여 얻어진 단백질의 생물학적 모사를 통한 '물리적 의의'를 알아보는 실험을 소개하고자 한다. 우리 몸에는 물리적 힘에 의해 활성화되거나 조절되는 단백질들이 많이 존재한다. 여기서는 그러한 단백질들 중 많이 연구

REFERENCES

- [18] H. Yu and M. T. Woodside, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **112**, 8308 (2015).
- [19] K. Neupane, J. Lambert and M. T. Woodside, J. Phys. Chem. Lett. **6**, 1005 (2015).

Fig. 10. Experiment schematic for applying force to a von Willebrand factor. Arrow indicates the A2 domain.^[23]

된 두 가지, von Willebrand factor와 talin에 대해 보고된 결과들을 소개해보도록 하겠다.

힘에 의한 von Willebrand factor의 활성 조절

von Willebrand factor(VWF)는 생체 내에서 가장 큰 수용성 단백질 중 하나이며 지혈 현상의 조절에 중요한 역할을 한다. 이 단백질 하나의 분자량은 대략 ~ 240 kDa이지만, N-말단과 C-말단의 시스틴들의 결합을 통해 최대 ~ 200 개가 일렬로 연결되는 특성이 있으며, 보통 이러한 상태로 내피세포에서 분비가 된다. 이러한 거대 VWF 사슬(ultra large VWF; ULVWF)은 혈액에서 돌아다니거나, 분비한 세포의 표면 또는 손상된 조직에 붙은 상태로 존재하는데, 혈액의 흐름 때문에 유체 역학적 힘에 노출된다는 특징이 있다.^[20]

ULVWF는 분비 후 두 시간 내로 ADAMTS13이란 단백질로 인해 보다 작은 조각들로 분해가 되며, 이 조각들의 크기 분포에 따라 지혈반응이 일어난다. ADAMTS13에 의해 쪼개지는 부분은 단일 VWF에서 A2라 불리는 도메인(domain)인데, VWF 사슬이 매우 길면 ADAMTS13에 의해 잘 잘리는 반면, 사슬이 짧으면 잘리지 않는다.^[21] 단백질이 길면 길수록 혈액의 전단력에 의해 받는 힘이 클 것이므로, 혈류로 인해 A2 도메인에 일정한 힘이 걸리면 A2의 구조가 변함으로서 ADAMTS13에 의해 잘 잘릴 수 있게 될 것으로 추측이 되고 있었다.^[22]

Timothy A. Springer 연구팀은 광학 집게 기술을 이용해 이 가설을 검증하였다.^[23] 먼저 하나의 VWF 단백질의 N-말단과 C-말단에 DNA 조각을 연결하고, 이 DNA 조각들을 bead들에 연결하였다(그림 10). 이렇게 VWF를 당겨보자, 5~15 pN 즈음의 힘이 걸렸을 때 단백질이 풀림을 관찰하였다. 여기서 WLC(worm like chain) 모델을 통해 추론한 길이 변화는 ~ 58 nm로서, A2 domain을 구성하는 아미노산들이 완전히

Fig. 11. Representative traces of VWF unfolding and cleavage. At ~ 10 pN force, VWF unfolds, and becomes cleavable by ADAMTS13. If there is no enzyme, the unfolded state is maintained, but no cleavage occurs.^[23]

늘어났을 때 예상되는 길이와 일치하는 값이었다.

이렇게 힘에 의해 VWF 분자가 풀린 뒤, 5 pN 정도의 힘을 계속 유지시켜 주자 VWF가 다시 접히는 현상은 관찰되지 않았다. 이 상태를 유지하면, ADAMTS13가 없을 때에는 수 분 동안 특별한 변화가 없었지만, ADAMTS13가 같이 있을 경우에는 일정 시간 후 VWF가 분해됨이 관찰되었다(그림 11).

저자들은 여기서 더 나아가 VWF에 실제로 이러한 힘이 작용하는 것이 가능한지를 검토하였다. 고분자 역학에 따르면,^[24] N개의 VWF가 연결된 사슬에 혈관의 전단력이 작용할 경우, 사슬에 걸리는 힘은 사슬의 끝에서 사슬의 중심으로 갈수록 커지며, 이 중심값에서의 힘은 N의 제곱에 비례한다.^[24] 여기에 혈류의 전단력을 고려하면 VWF 사슬의 각 위치에 걸릴 수 있는 최대 힘을 알 수 있다. 이로부터 $N=200$ 일 경우 광학 집게 실험에서 관찰되었던 정도의 힘이 걸리며, 따라서 생체 내에서 존재 가능한 VWF 사슬의 최대 길이가 ~ 200 정도라는 예측이 가능하다. 이는 앞에서 언급했듯이 실제로 관찰되는 ULVWF의 크기와 일치하는 결과이다. 즉, 기존에 알려진 생물학적인 정보에 대한 물리학적 의미를 알아보고 그 이유를 증명하는 실험이라 볼 수 있다.

Talin에 작용하는 힘에 따른 vinculin 결합

세포가 올바르게 기능하는데 있어, 그 주변에 걸리는 힘을 감

REFERENCES

- [20] J. E. Sadler, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 395 (1998).
- [21] H. M. Tsai, *Semin. Thromb. Hemost.* **29**, 479 (2003).
- [22] H. M. Tsai, *Blood* **87**, 4235 (1996).
- [23] X. Zhang *et al.*, *Science* **324**, 5932 (2009).
- [24] J. A. Odell and A. Keller, *J. Chem. Phys.* **88**, 4022 (1988).

Fig. 12. Experiment schematic for applying force to a talin rod and observing vinculin binding. Green indicates talin rod, yellow indicates Alexa488-labeled vinculin. The red circle(labeled 'B') indicates a linkage through biotin-avidin binding, and the blue circle (labeled 'H') indicates histag-Ni-NTA binding.^[28]

지하는 것은 매우 중요하다. Talin과 vinculin은 세포의 접착(adhesion) 및 이동(migration) 등의 기능들을 수행하는데 중요한 역할을 하는 세포 골격 단백질들이다.^[25]

세포에 힘이 가해지면 vinculin이 국소 접착(focal adhesion)에 모이는 것이 관찰된다. 한편, talin은 막 단백질인 integrin이란 단백질과 상호작용하는 FERM 도메인과, vinculin이 최대 11개까지 붙을 수 있는 talin 막대(talin rod; TR)로 구성되어 있다.^[26] Vinculin이 talin에 붙으면 그 형태가 변하며 세포골격을 변화시키는 각종 세포 신호 전달이 일어난다. 그러나 talin의 vinculin 결합 부위(vinculin binding site)들은 평소엔 소수성 상호작용 때문에 외부로 노출이 되어있지 않다.^[27] 따라서 talin이 외력에 의해 당겨지면 vinculin이 붙을 수 있게 변화되는 식으로 작동이 될 것으로 추측이 되었다.

Michael P. Sheetz 팀은 자기 집게와 형광 이미징을 통해 이를 확인하였다.^[28] 먼저 TR을 N-말단의 his tag와 C-말단의 biotin(avi-tag)을 이용해 이미징 표면과 자기 비드에 연결하였다. 이를 통해 TR을 당기면서, 개당 하나의 형광물질이 달린 vinculin을 이미징함으로써 당기는 TR에 vinculin이 얼마나 결합하는지 관찰하였다.(그림 12)

형광은 전반사 형광 이미징을 통해 슬라이드 표면의 TR에 붙은 vinculin들만 관찰이 가능하였는데, 이때 vinculin의 개수는 총 나타나는 광퇴색(photobleaching) 신호를 통해 측정되었다. 예상과 같이, TR에 힘이 걸리지 않은 상태에서는 대부분 1개의 vinculin만 결합이 가능했지만, 힘이 많이 가해질수록 vinculin이 더욱 많이 결합하는 것이 관찰되었다(그림 13). 여기서 사용된 힘은 2 ~ 12 pN 정도이다. 한편, integrin과, integrin이 결합

Fig. 13. Representative traces of Alexa488 photobleaching (above) and the number of beads that showed such behavior (below).^[28]

하는 fibronectin 단백질들이 최대 20 pN 정도의 힘을 견딜 수 있던 점을 감안하면,^[29] 이 실험에서 적용된 힘은 생체 내 현상을 모사하는데 적절한 수준이다.

나오는 글

생물학과 물리학의 경계에서 융합된 생물물리학은 생물학적 모사를 통하여 생체 분자(biomolecule)가 갖고 있는 특정한 물리량과 생체계(biosystem)의 물리적 의미를 도출하는 것으로 귀결되어진다. 단백질들이 이중 지질막에 따로 존재하는 이유는 무엇인가? 단백질들은 얼마만큼의 에너지를 갖고 접힌 상태로 존재하며 그 값은 합리적인가? 전통적인 실험에서 이러한 질문들을 답변하기란 쉽지 않았다. 더욱이, 기존 생화학적 실험 모두 앙상블 평균(ensemble average)을 통한 벌크(bulk) 실험이기에 개별 단백질들의 특징과 물리적 특성을 파악하기란 쉽지 않았다. 생물물리학은 기존 생체계를 바라보는 시각의 패러다임을 바꾸고 있으며 이러한 시각은 생물학을 이해하는 또 다른 열쇠가 될 것임이 분명하다. 생체계의 모사를 통하여 생체분자가 갖고 있는 고유한 '물리량'과 그 시스템의 '물리적 의미'를 알아보는 것은 매우 중요한 일이며 앞으로 생체 시스템을 이해하는 데에 중요한 밑거름이 될 것이다.

REFERENCES

- [25] D. R. Critchley, Biochem. Soc. Trans. **33**, 1308 (2005).
- [26] A. R. Gingras *et al.*, J. Biol. Chem. **280**, 37217 (2005).
- [27] T. Izard *et al.*, Nature **427**, 171 (2004).
- [28] A. del Rio *et al.*, Science **323**, 5914 (2009).
- [29] G. Jiang *et al.*, Nature **424**, 334 (2003).