최신 단분자 분광학의 기술 동향

DOI: 10.3938/PhiT.29.012

이 자 일

Recent Advances in Single-Molecule Spectroscopy

Ja Yil LEE

For several decades, the advance of single-molecule spectroscopy has been making significant progress in life sciences. Single-molecule spectroscopy enables us 1) to reveal substates hidden by the ensemble average effect in traditional methods, 2) to manipulate biomolecules mechanically, and 3) to investigate biomolecular interactions in a more direct manner. Representative single-molecule techniques, such as single-molecule FRET and optical tweezers, that were developed early have now permeated into many areas of life sciences and are considered to be common biological methods. Besides them, new single-molecule techniques have been developed for investigating more details of biological reactions. Furthermore, attempts to observe diverse phenomena inside a living cell have been made at the single molecule level. Here, I introduce several in vitro single-molecule techniques that were recently developed and live cell imaging tools for single-molecule observation in vivo. These techniques will shed light on the future direction of single-molecule spectroscopy in life sciences.

서 론

1989년 W. E. Moerner가 p-terphenyl 결정에서 pentacene 분자 하나의 흡수 스펙트럼을 측정한 이후에 단분자 분광학 기술은 폭발적으로 발전하였으며, 특히 생명과학분야에 있어서 커

저자약력

이지일 교수는 2006년 서울대학교 물리학과에서 단일분자 분광학을 이용한 텔로미어 DNA의 구조동역학에 대한 연구로 박사학위를 취득하였다. 2006년부터 2008년까지 고려대학교에서 연구교수, 2008년부터 2016년까지 미국 컬럼비아대학교에서 박사후연구원을 거쳐, 2016년부터 현재까지 울산과학기술원(UNIST) 생명과학부에서 단일분자 이미징을 이용하여 DNA 손상 복구 기전, 크로마틴 동역학, 단백질과 DNA의 상호작용 등에 대하여 연구를 수행하고 있다. (biojayil@unist.ac.kr)

다란 돌파구를 제공하였다.^[1] 단분자 분광학은, 몰(mole: $\sim 10^{23}$) 수준의 분자들의 평균적인 효과를 측정하던 기존의 생화학적 혹은 분자생물학적 방법과 달리, 생체분자 하나를 관찰함으로써 기존 방법들로 밝힐 수 없었던 새로운 상태를 발견할 수 있으며 생체분자들의 구조 변화 및 구조동역학(conformational dynamics)을 정확하게 측정할 수 있는 첨단 측정 기법이다.^[2,3] 또한, 단분자 분광학 기술을 사용하여 분자들의 상호작용을 보다 세밀하게 관찰할 수 있으며, 생체분자들의 역학적 특성을 파악하거나 역학적으로 조작할 수 있다.^[3-5] 현재까지 다양한 단분자 분광학 기법들이 개발되었으며, 그 방식에 따라서 크게 광학측정법, 역학측정법, 그리고 전기적측정법으로 나눌 수 있다(그림 1). 광학측정법은 대부분 형광을 이용하는데, 각 생체분자에 형광체 하나를 표지하여 그 형광체에서 나온 형광신호를 측정함으로써 단분자를 관찰하는 방법이다. 높은 형광효율의 형광체와 발전된 광측정(CCD) 기술을 이용하여 높은 SNR(signal-to-noise ratio)을 확보할 수 있으며, 형광체를 생체분자에 결합시키는 화학적 기법들이 이미 잘 알려져 있기 때문에, 다양한 형광체를 생체분자의 원하는 위치에 표지할 수 있다. 무엇보다도, 형광이미징을 통해서 생체분자의 변화와 움직임을 보다 직접적으로 관찰할 수 있다. 형광을 이용한 대표적인 단분자 분광학으로는 단분자 FRET(Single-molecule Förster Resonance Energy Transfer, smFRET), FCS(fluorescence correlation spectroscopy), 단일 입자 추적(single particle tracking) 등의 기법들이 개발되었다(그림 1(A)). 반면, 형광체 표지를 위해서 생체분자를 화학적으로 변형시켜야 하며, 형광체의 광퇴색(photobleaching)으로 인해서 측정 시간이 제한되는 단점이 있다. 두 번째, 역학측정법은 광학 집게(optical tweezers), 자성집게(magnetic tweezers), 혹은

REFERENCES

- [1] W. E. Moerner and L. Kador, Phys Rev Lett. **62**, 2535 (1989).
- [2] Ch. Zander and R. A. Keller, *Single Molecule Detection in Solution Methods and Applications*, 1 ed. (Berlin, WILEY-VCH, 2002).
- [3] H. Miller, Z. K. Zhou, J. Shepherd, A. J. M. Wollman and M. C. Leake, Rep. Prog. Phys. **81**, 024601 (2018).
- [4] K. C. Neuman and A. Nagy, Nat. Methods **5**, 491 (2008).
- [5] C. Bustamante, Z. Bryant and S. B. Smith, Nature **421**, 423 (2003).

Fig. 1. Single-molecule technique that were early developed. (A) Optical method: single-molecule FRET (smFRET). (B) Mechanical method. (Top) optical tweezers. Reprinted with permission from REFERENCE CITATION. Copyright YEAR American Chemical Society.^[9] (Bottom) magnetic tweezers. (C) Electric method: carbon nanotube electrode for the structural change of F1 ATPase. Reprinted with permission from REFERENCE CITATION. Copyright YEAR American Chemical Society.^[6]

AFM(atomic force microscopy)을 이용하여, 하나의 생체분자에 힘 혹은 토크를 가하여 생체분자의 역학적 특성을 파악하거나, 생체분자들을 당기거나 끄는 등 물리적으로 변형시킬 수 있다 (그림 1(B)).^[4,5] 또한 생체분자들이 상호작용할 때 발생하는 힘과 토크를 측정함으로써, 분자들 사이의 작용을 보다 세밀하게 관찰할 수 있다. 세 번째로, 전기적측정법은 전류 혹은 전압의 변화를 측정하는 기법으로, 위의 형광 및 역학측정 방식들에 비해서 훨씬 빠르고 미세하게 생체분자들의 변화를 측정할 수 있다. 따라서 생체분자뿐만 아니라 화학분자들의 결합 및 구조의 변화(isomerization)를 측정할 수 있다(그림 1(C)).^[6] 또한 기존의 반도체 기술과 융합하여 소형 진단 장치로 이어질 수 있다. 이러한 단분자 분광학 기술들은 각각 장점과 단점을 가지고 있다. 따라서 각 기술들의 장점을 취하고, 단점을 보완하기 위해서 두 가지 기술을 융합하려는 시도들도 행해졌다. 좋은 예로, 광학집게 혹은 자성집게와 smFRET을 융합하여, 힘 혹은 토크를 가하면서 DNA와 단백질의 구조동역학을 연구하였다.^[7,8]

이렇듯 지금까지 다양한 단분자 분광학 기술들이 개발되었고, 이들을 통해서 수많은 생체분자들이 새로 연구되고 있으며, 보다 구체적인 분자기전(molecular mechanism)이 밝혀지고 있다. 위에서 언급한 대표적인 기술들 외에도 여러 새로운 단분자 분광학 기술들이 개발되었으며, 이들을 통해서 생체분자들의 기능과 특성을 다른 각도에서 바라볼 수 있게 되었다. 단분자 분광학 기술들은 거의 대부분 세포 외부에서(in vitro), 특히 정제된 생체분자들에 대한 연구에 활용되고 있다. 이러한 in vitro 실험들은 실제 세포 내에서 생체분자들의 기능과 역할을 완벽하게 이해할 수 없기 때문에 그 한계를 가지고 있다. 이러한 한계를 넘어서고자 세포 내에서 생체분자들이 어떻게 자신의 역할을 수행하는지를 단분자 수준에서 관찰하고자 하는 노력들이 진행되고 있다. 따라서 이 글에서는 기존의 단분자

분광학 기술에서 진보한 single particle tracking 기법들과 high speed AFM(HS-AFM)을 통한 이미징 기술 및 살아있는 세포 내에서 단분자 이미징 기술들에 대해서 살펴보고자 한다. 그리고 현재 국내의 단분자 분광학 연구의 현황을 간략하게 언급하고자 한다.

본 론

1. Single particle tracking

모든 생명활동은 생체분자들 사이의 복잡한 화학반응들을 통해서 이루어진다. 이러한 화학반응들은 기본적으로 생체분자들 사이의 충돌에 의해서 이루어지기 때문에, 분자들의 움직임을 관찰하는 것은 생명현상을 이해하는 데 중요하다. 다수의 생체분자들을 측정하는 기존의 생화학적 분석방법과 광학분해능에 제한된 전통적인 현미경 기법들은 생체분자들의 움직임과 그들 사이의 상호작용을 관찰하는 데 한계를 가진다. 반면, single particle tracking은 하나의 생체분자(DNA, RNA 혹은 단백질)에 하나의 형광체를 표지하고, 각각의 형광신호를 형광현미경을 통해서 추적한다. 이때, 형광신호를 이차원 가우시안함수(Gaussian function)를 이용하여 fitting하여 그 중심 좌표를 읽어내는 point

REFERENCES

- [6] Y. Li, C. Yang and X. F. Guo, Accounts Chem. Res. **53**, 159 (2020).
- [7] T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito and A. Toda, P. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12468 (2001).
- [8] M. Lee, S. H. Kim and S. C. Hong, P. Natl. Acad. Sci. USA **107**, 4985 (2010).
- [9] I. Heller, T. P. Hoekstra, G. A. King, E. J. G. Peterman and G. J. L. Wuite, Chem. Rev. **114**, 3087 (2014).

Fig. 2. Principle of single particle tracking.^[10] Trace single biomolecule by measuring the center coordinates of 2D Gaussian function (point spreading function: PSF), by which fluorescence intensity is fitted, per each frame.

spread function(PSF) 기법을 활용하여 광학분해능의 한계를 극복한다(그림 2).^[10] 이러한 single particle tracking은 세포 외부와 세포 내에서 생체분자들의 움직임을 파악하는 데 활발하게 사용되고 있다. 이 글에서는 이러한 single particle tracking을 사용하는 단분자 이미징 기법들에 대해서 소개하고자 한다.

DNA는 유전정보를 포함하고 있으며, 이러한 유전정보의 발현과 복제, 그리고 손상복구는 DNA와 단백질의 상호작용을 통해서 이루어지며, 이러한 DNA 대사활동(DNA metabolism)은 생체분자들의 반응들 중 가장 근원이 되는 반응이다. 단백질이 DNA와 상호작용할 때, 많은 경우 특정한 염기서열 혹은 특정한 구조에 결합한다. 이렇게 특정 염기서열 혹은 구조를 표적부위(target site)라고 한다. 단백질들이 DNA 상의 표적부위를 어떤 기전으로 발견하는지는 생물학적으로나 물리적으로 굉장히 중요한 문제이다. 물리적으로 DNA는 세포핵이라는 3차원 공간에 갇혀 있는 실과 같은 1차원 고분자이다. 그리고 표적부위는 단백질에게 DNA 위의 다른 영역보다 에너지적으로 더 안정적인 부분이다. 따라서 표적부위 탐색은 단백질이 3차원 공간에 있는 1차원 구조의 고분자물질에서 국소적으로 낮은 에너지영역을 발견하는 물리적 문제이다. 생물학적으로는 단백질이 표적부위를 얼마나 빠르게 발견하는지가 특정 생체반응의 시간을 결정한다. 즉, DNA가 손상을 입었을 경우, 이를 빠른 시간 내에 복구하지 않으면 유전적으로 큰 문제를 야기할 수 있다. 더구나, DNA에는 수많은 단백질들이 이미 결합하고 있기 때문에 이러한 단백질 장애물들을 피해서, 표적부위를 어떻게 발견하는지는 생물학적으로 상당히 중요하다. 지금까지 단백질들이 DNA 상의 표적부위를 탐색하는 기전들로 단순한 화학반응과 같은 3차원 충돌, 1차원 확산, 그리고 DNA의 한 영역에서 다른 영역으로 뛰어넘는 intersegmental transfer, 그리고 화학에너지(ATP 가수분해)를 사용하여 빠르게 움직이는 translocation 등이 제시되었다(그림 3). 단백질이 이들 중 어

Fig. 3. Mechanisms by which a protein searches for its target site on DNA.

떤 기전을 따르는지 기존의 생화학적인 실험으로는 정확하게 파악하기 어렵지만, single particle tracking은 이러한 문제에 대한 가장 확실하고 직접적인 해답을 제시한다.

DNA 위에서 단백질의 움직임을 단분자 수준에서 관찰하기 위해서, 일반적으로 DNA 각각을 슬라이드 표면 위에 펼친 후, 형광이 표지된 단백질을 넣어 펼쳐진 DNA 위에서 단백질들이 어떻게 움직이는가를 single particle tracking을 이용하여 관찰한다. DNA를 슬라이드 위에 펼치는 다양한 방법들이 제시되었으며, 최근에 개발된 기술 중에 하나로 'DNA 커튼'이 있다. DNA 커튼은 고체 표면 위에 놓여진 지질이중막인 'supported lipid bilayer'를 이용한 기술이다. 이 지질이중막의 지질분자들은 이중막 내에서 자유로이 움직이는 유동성을 가지고 있지만, 나노미터 크기의 선형구조물(도랑 혹은 장벽)에서는 이중막의 bending energy가 커지기 때문에, 지질분자들이 이러한 선형 나노구조물을 넘어서지 못한다.^[11] 지질분자 하나에 DNA 분자 하나를 결합하고, 용액을 흘려주면, DNA는 유체에 의한 쓸림힘(shearing force)을 받게 된다. 이 힘에 의해서 DNA가 결합된 지질분자는 지질이중막 위에서 유체방향으로 움직이다가 선형 나노구조물에서 멈추게 되지만, DNA는 유체에 의해서 펼쳐지게 된다. 지질이중막 위에 있는 모든 DNA 분자들이 쓸림힘에 의해서 선형 나노구조물을 따라 모이게 되므로, 수백 개에 달하는 DNA 분자들이 선형 나노구조물에 배열된다. 이때, 유체 흐름을 차단하면, DNA 분자들은 다시 자유로운 코일형태를 띄게 되고, 지질 분자들은 확산을 통해서 선형 나노구조물로부터 멀어진다. DNA 분자들을 intercalating 형광체로 염색하고, 슬라이드

REFERENCES

- [10] C. Manzo and M. F. Garcia-Parajo, Rep. Prog. Phys. **78**, 124601 (2015).
- [11] P. S. Cremer and S. G. Boxer, J. Phys. Chem. B. **103**, 2554 (1999).

Fig. 4. DNA curtain technique. (A) Schematics of single-tether DNA curtain. DNA at the nano-barrier in the (left) absence and (right) presence of buffer flow. Reprinted with permission from REFERENCE CITATION. Copyright YEAR American Chemical Society.^[12] (B) (Top) schematic of double-tether DNA curtain and (bottom) DNA curtain images to observe the protein movement on a single DNA molecule.^[13]

이드 표면만을 관찰할 수 있는 전반사 형광 이미징 기법(total internal reflection fluorescence microscopy)을 사용하여, 표면에 펼쳐진 DNA만을 관찰한다(single-tether DNA 커튼)(그림 4A).^[12] 이 single-tether DNA 커튼의 경우는 항상 유체를 흘려주어야 DNA가 펼쳐지게 되므로, 용액과 샘플의 소모가 크고, 단백질의 움직임에 있어서 항상 유체에 의한 외력이 작용하게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 두 개의 나노장벽을 제작한다. 한 장벽은 DNA가 결합된 지질의 움직임을 막고, 또 다른 장벽에는 항체-항원 반응을 통해서, 지질과 결합되지 않은 반대편 DNA 끝이 결합되어서, 유체의 흐름이 없어도 DNA의 양끝이 바닥에 고정이 되어, 펼쳐진 상태로 있을 수 있도록 한다(double-tether DNA curtain)(그림 4B).^[13] 이렇게 펼쳐진 DNA에 형광이 표지된 단백질을 넣어서 단백질의 움직임을 single particle tracking 기법을 이용하여 실시간으로 이미징한다.

현재까지 DNA 커튼 기법을 이용하여 다양한 단백질의 움직임과 표적 탐색 기전이 연구되고 있다. 특히, DNA의 손상을 회복하는 데 중요한 역할을 하는 단백질의 연구가 최근에 주목받고 있다.^[14] XPC-RAD23B는 사람의 nucleotide excision repair(NER)에서 자외선에 의해서 손상된 염기를 인식하는 단백질이다. 사람의 염기쌍은 대략 30억 개이고, XPC-RAD23B는 이들 중에서 하나의 염기에 생긴 손상을 인식한다. 그리고 손상 부위에 다른 NER 단백질들이 결합되는 것을 유도하고, 이렇게 결합된 NER 단백질 complex에 의해서 손상된 염기가 제거된다. 따라서 XPC-RAD23B가 손상된 염기쌍을 얼마나 빨리 발견하는지가 손상된 염기를 얼마나 빨리 복구하는가를 결정한다. 이를 연구하기 위해서, XPC-RAD23B를 형광나노입자인 quantum dot(Qdot)으로 표지한 후, double-tether DNA 커튼에서 움직임을 관찰하였다(그림 5). XPC-RAD23B는 DNA의 염기서열과 무관하게 결합한 후, DNA 위를 브라운 운동(Brownian motion, 1차원 확산(diffusion))을 통해서 이동한다는 것이 밝혀졌다(그림 5A). 1차원 확산과정을 정량적으로 분석하기 위해서

확산계수(diffusion coefficient)를 염(NaCl)의 농도에 따라서 측정하였는데, NaCl 농도가 증가함에 따라 확산계수가 굉장히 크게 증가하였다(그림 5B). 이는 XPC-RAD23B가 DNA 위를 확산하면서 염도(salt concentration)에 큰 영향을 받는다는 것을 의미한다. 단백질이 DNA 위에서 확산을 통해서 움직일 때, sliding과 hopping이라는 두 가지 방식이 있다고 알려졌다. Sliding 모드로 확산하는 단백질은 DNA와 지속적인 접촉을 유지하면서 움직이기 때문에, NaCl 농도의 변화에 둔감하다. 반면, hopping mode로 확산하는 단백질은 DNA에서 미시적으로(microscopically) 떨어졌다가 다시 붙는 방식으로 움직이기 때문에, NaCl의 농도가 증가할수록 DNA와 단백질 사이에 정전기적 인력이 줄어들어 더 멀리 움직이게 되고, 확산계수는 증가한다. 따라서 XPC-RAD23B는 hopping을 통해서 DNA 상에서 확산한다. Hopping 모드에서는 DNA에서 미시적으로 떨어지기 때문에, hopping 모드로 움직이는 단백질은 DNA에 결합되어 있는 다른 단백질과 충돌했을 때, 이를 뛰어넘을 수 있다. Hopping을 통하여 단백질 장애물을 뛰어넘는 것은 DNA 커튼 실험을 통해서 직접적으로 관찰할 수 있다. 단백질 장애물로 돌연변이 EcoRI(EcoRI-E111Q)을 DNA 상에 결합시키고, 녹색 파장의 Qdot으로 표지한다. XPC-RAD23B는 적색 파장의 Qdot으로 표지하여 두 단백질의 충돌을 관찰하면, XPC-RAD23B가 EcoRI-E111Q를 만났을 때, EcoRI-E111Q를 지나쳐 가는 것을 볼 수 있다(그림 5C). 이러한 hopping은 DNA 상의 단백질 장애물들을 뛰어넘기 때문에, 수많은 단백질들이 결합되어 있는 크로마틴 구조에서 빠르게 DNA 손상 부위를 찾도록 해주고 이

REFERENCES

- [12] T. Fazio, M. L. Visnapuu, S. Wind and E. C. Greene, Langmuir **24**, 10524 (2008).
- [13] J. Y. Lee, I. J. Finkelstein, E. Crozat, D. J. Sherratt and E. C. Greene, P. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 6531 (2012).
- [14] N. Y. Cheon, H. S. Kim, J. E. Yeo, O. D. Scharer and J. Y. Lee, Nucleic Acids Res. **47**, 8337 (2019).

Fig. 5. Investigation of nucleotide excision repair protein, XPC-RAD23B, using DNA curtain. (A) (Top) schematic of DNA curtain and (bottom) kymograph showing the diffusive motion of XPC-RAD23B. (B) Diffusion coefficients of XPC-RAD23B according to NaCl concentration. (C) Collision experiment between XPC-RAD23B (red) and EcoRI-E111Q (green) using DNA curtain. (Top) Schematic of collision experiment and (bottom) kymograph showing collisions between the two molecules.

를 통해서 DNA 염기손상이 보다 빨리 복구되도록 한다.

세포 외부에서 생체분자들을 합성 혹은 정제하여 관찰하는 단분자 이미징 기술의 발전과 더불어, 살아있는 세포 내에서 생체분자들이 어떻게 움직이고 서로 상호작용하는지 관찰하려는 노력들이 이루어져 왔다. 이는 당연히 살아있는 세포 내에서의 생체분자들을 관찰하는 것이 생물학적으로 보다 직접적이고 의미 있기 때문이다. 살아있는 세포 내에서 생체분자들을 관찰하는 기존의 방법들로 DNA에만 결합하는 형광체를 처리해서 DNA를 관찰하거나 GFP(green fluorescent protein)과 같은 형광단백질 유전자를 표적 단백질과 결합시켜 관찰하는 방법들이 있다. 하지만, DNA는 전체적으로 염색이 되기 때문에 특정한 염기서열이 세포 핵 어디에 있는지와 그 영역이 세포 핵 내에서 어떠한 움직임을 보이는지를 파악할 수 없다. FISH(fluorescence in situ hybridization)를 사용하여, DNA의 특정한 염기서열을 관찰할 수 있으나, 세포를 고정화(fixation)시키기 때문에 살아있는 세포를 관찰할 수 없다. 단백질의 경우도, GFP가 달린 단백질들이 많이 발현되면 단분자 수준에서 관찰할 수 없으며 단백질들의 움직임을 추적하기 어렵다. 이러한 한계를 극복하고, 최근 살아있는 세포 내에서 DNA 혹은 RNA의 움직임을 단분자 수준에서 관찰하는 기술이 개발되었다.

살아있는 세포에서 크로마틴(염색체의 DNA 부분)의 특정 영역을 인식하기 위해서 여러 노력들이 행해져 왔으며, 그 중 하나가 CRISPR-Cas9을 이용하는 방법이다(그림 6A).^[15] CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)는 외부에서 침입한 DNA를 제거하는 박테리아의 방어기전으로, 외부 DNA 염기서열에 상보적인 짧은 RNA(guide RNA, gRNA)와 CRISPR 단백질(Cas9)이 결합하여, 외부 DNA를 인식한 후 절단한다. 따라서 Cas9은 DNA 염기서열에 상보적인 gRNA가 있으면, 그 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있다. 최근에 유전자 조작 기술을 이용하여, Cas9에서 DNA를 절단하는 능력만을 제거한 dCas9이 개발되었다. 따라서 세포 내에서 특정 DNA 염

기서열에 상보적인 gRNA와 형광(GFP)이 표지된 dCas9을 동시에 발현시키면, 형광이 달린 dCas9이 gRNA를 매개로 크로마틴 상에 특정한 염기서열에 결합하게 되고, 이 형광신호를 추적 (single particle tracking)함으로써, 세포핵 내에서 크로마틴이 어떻게 분포되어 있으며 어떻게 움직이는지 파악할 수 있다. CRISPR-Cas9의 가장 큰 장점은 gRNA의 염기서열을 바꿈으로써, 크로마틴 상의 다른 영역을 쉽게 관찰할 수 있다는 것이다. 하지만 gRNA 염기서열의 개수가 제한적이라서 비특이적인 결합 (off-target effect)이 발생할 수 있다. 이러한 dCas9 시스템을 이용해서, 살아있는 세포에서 반복적인 염기서열을 가진 텔로미어와 단일 염기서열을 가진 MUC4 유전자의 위치를 이미징함으로써 이들의 움직임을 관찰하였다.^[16] 이후, 이를 이용하여 크로마틴의 구조와 그 동역학에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다.^[15]

크로마틴뿐만 아니라, single particle tracking을 사용하여 살아있는 세포 내에서 RNA에 대한 연구도 활발하게 진행 중에 있다. mRNA는 DNA의 유전정보를 아미노산 사슬인 단백질로 바꾸어 주는 매개체로 유전자 발현 및 발현 조절에 핵심적인 역할을 수행한다. 이에 mRNA를 이미징하는 연구가 최근 들어 활발하게 진행 중인데, 주로 RNA aptamer와 이 aptamer에 결합하는 단백질들에 의해서 이루어진다. Aptamer는 짧은 RNA의 이차구조형태로 전사(transcription) 과정 중에 형성된다. 이 aptamer를 표적이 되는 mRNA의 3' UTR(UnTranslated Region)에 12개에서 128개 정도로 반복적으로 삽입하고, aptamer에 특이적으로 결합하는 단백질을 형광으로 표지하여, 표적 mRNA를 추적한다. 하나의 mRNA에 형성된 다수의 aptamer들에 다수의 형광단백질들이 결합하여 강한 형광을 낼 수 있어서, 세포

REFERENCES

- [15] H. Sato, S. Das, R. H. Singer and M. Vera, Annual Reviews of Biochemistry **89**, 29 (2020).
- [16] B. H. Chen, L. A. Gilbert, B. A. Cimini, J. Schnitzbauer, W. Zhang, G. W. Li *et al.*, Cell **155**, 1479 (2013).

Fig. 6. Techniques of single particle tracking in a living cell. (A) Observation of a specific DNA region using dCas9.^[15] (B) Method to observe mRNA using 3' UTR aptamer. (C) Method to visualize translation using epitope at N-terminus and its fluorescently-labeled antibody.

의 자체 형광(autofluorescence)에 의한 background에도 단분자 수준에서 mRNA를 관찰할 수 있다. 이러한 단분자 mRNA 이미징 기술을 사용하여, 살아있는 쥐의 뉴런(neuron) 세포와 뇌조직에서 actin의 mRNA가 어떻게 이동하는지 실시간으로 이미징하였으며, 이를 통해서 핵에서 합성된 mRNA가 neuron 세포의 필요한 영역에 어떻게 위치할 수 있는가를 밝혔다.^[17]

단분자 이미징 기술은 살아있는 세포에서 mRNA를 이미징하는 것과 더불어, 하나의 mRNA에서 단백질이 합성되는 번역(translation) 과정을 이미징하는 것을 가능하게 하였다.^[18] 대표적인 방법은 합성되는 아미노산 epitope에 특이적으로 결합하는 형광이 표지된 항체를 이용하는 것이다. 아미노 말단(N-terminus)에 다수의 반복적인 epitope를 삽입하고, 번역이 시작되면 이 epitope에 결합하는 형광이 달린 항체가 결합하게 되고, 다수의 형광항체의 결합으로 번역과정을 단분자 수준에서 확인할 수 있게 된다. 또한 위에서 언급한 mRNA 추적 기술과 융합하여, 표적 mRNA에서 translation이 일어나는 것을 이미징할 수 있다. 또한 polysome을 추적함으로써 translation의 동역학적 특성을 정량적으로 측정할 수 있다.^[19]

2. High-speed AFM(HS-AFM)

AFM은 1986년 개발되어, 수많은 고체물질의 표면 연구에 사용되었다.^[20] AFM은 원자 수준의 공간분해능(나노미터 혹은 그 이하)으로 표면을 이미징할 수 있으며, 캔틸레버(cantilever)를 이용하여 미세한 힘을 측정해 낼 수 있다.^[21] AFM을 이용한 단분자 분광학으로는 단백질의 양 끝단을 AFM의 캔틸레버 팁 끝과 바닥에 고정시킨 후, AFM으로 단백질을 당기면서 단백질의 풀림(unfolding)과 접힘(folding) 과정을 관찰하는 방식이 개발되었다. 이러한 관찰이 가능한 것은 AFM이 다른 역학적 단분자 분광학

기술들(광학집게 혹은 자성집게)보다 더 큰 힘을 가할 수 있기 때문이다. 한편, AFM을 이용한 생체분자들(DNA, 단백질)의 이미징은 굉장히 오랫동안 다양하게 이루어져 왔다.^[21] 이들 대부분은 mica 표면에 생체분자들을 고정시킨 후, 수용액 상태가 아닌 건조된 상태에서 AFM을 scanning하여 이미징하였다. 또한 AFM scanning 시간에 대한 한계로 대부분 평형상태의 관찰에 국한되었으며, 생체분자들의 동역학적 특성을 파악하기는 어려웠다. 이러한 한계는 2000년대 들어서면서, 습식 AFM(wet AFM)이 개발되고, 고주파에서 작동이 가능한 작은 스프링상수를 가지는 소형 캔틸레버가 제작되었으며, 이 소형 캔틸레버에 맞는 OBD(optical beam deflector)의 개발로 빠르게 scanning하는 AFM이 가능하게 되었다. 이를 통해서 GroEL과 GroES의 상호작용 및 actin filament 위에서 MyosinV의 움직임을 실시간으로(12.5 Hz frame rate) 이미징하였다^[7,22](그림 7A). 이후, HS-AFM은 다양한 단백질의 연구에 응용되었다. 특히, 실제로 단백질의 구조적 변화를 단분자 수준에서 실시간으로 관찰할 수 있다는 장점을 활용하여, 단백질의 구조동역학을 연구하는 데 활발하게 사용되고 있

REFERENCES

- [17] H. Y. Park, H. Lim, Y. J. Yoon, A. Follenzi, C. Nwokafor, M. Lopez-Jones *et al.*, *Science* **343**, 422 (2014).
- [18] T. Morisaki and T. J. Stasevich, *Csh. Perspect Biol.* **10**, a032078 (2018).
- [19] T. Morisaki, K. Lyon, K. F. DeLuca, J. G. DeLuca, B. P. English, Z. J. Zhang *et al.*, *Science* **352**, 1425 (2016).
- [20] T. G. Uchihashi and C. Ganser, *Recent advances in bioimaging with high-speed atomic force microscopy*, *Biophysical Reviews* (2020).
- [21] PLTM Frederix, T. Akiyama, U. Staufer, C. Gerber, D. Fotiadis, D. J. Muller *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 641 (2003).
- [22] M. B. Viani, L. I. Pietrasanta, J. B. Thompson, A. Chand, I. C. Gebeshuber, J. H. Kindt *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* **7**, 644 (2000).

Fig. 7. Studies on biomolecules using high-speed AFM. (A) Observation of the movement of myosin V on actin filament. Copyright (2001) National Academy of Sciences, U.S.A.^[7] (B) (Top) structure of Abo1 in the presence of ADP and ATP and (bottom) imaging of real-time structural change of Abo1. (C. Cho, J. Jang, Y. Kang, H. Watanabe, T. Uchihashi, S. J. Kim, K. Kato, J. Y. Lee & J.-J. Song, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13743-9>. Used under CC BY 4.0.)^[23]

다. 그 예로, 분열 효모인 *Schizosaccharomyces pombe*의 AAA+ ATPase인 Abo1의 ATP 가수분해에 따른 구조의 변화를 관찰하였다(그림 7B).^[23] Abo1의 구조는 cryo-EM을 통해서 최근 밝혀졌는데, ATP가 없을 때는 Abo1은 homo-hexamer로 대칭적인 반지형태의 구조를 가지고 있으며, 각 monomer당 하나의 ATP가 결합할 수 있다. ATP가 결합할 경우, 대칭구조가 깨지면서 비대칭적 형태를 가지게 된다. 이러한 구조변화를 HS-AFM을 이용해서 실시간으로 관찰하였으며, 이를 통해서 Abo1이 ATP를 각 monomer들 사이에 서로 연관성 없이 무작위적으로 가수분해한다는 것을 밝혔다. 시간분해능의 한계를 극복하고 높은 공간분

해능으로 단분자 이미징이 가능한 HS-AFM은 앞으로 생체분자 연구에 더 많이 활용될 것으로 기대된다.

국내 단분자 분광학 동향 및 맺음말

현재 국내 단분자 분광학 기법으로 생명현상을 탐구하는 실험실은 대략 20여 곳에 이른다. 대부분의 단분자 분광학 실험실에서는 형광을 이용한 단분자 이미징 기술인 smFRET과 역학적기법인 광학집게와 자성집게를 사용하여 생체분자들의 특성을 이해하는 연구를 진행하고 있다. 하지만, 최근 들어, single particle tracking 기술을 활용하여 세포 밖에서(in vitro) 혹은 살아있는 세포 내(in vivo)에서 단일 생체분자들의 움직임에 대한 연구가 활성화되고 있다. 비록 위에서 언급하지는 않았지만, 단분자 이미징 기법을 진척시켜, 기존의 광학분해능의 한계를 극복한 초고해상도 형광현미경 기법(super-resolution fluorescence microscopy)을 이용하여 세포를 연구하는 연구실들도 증가하고 있다. 하지만, 아쉽게도 AFM 및 HS-AFM을 이용하여 연구하는 실험실은 아직 국내에는 없다. 각 단분자 분광학 실험실들은 각자의 기술을 바탕으로 다양한 생명 현상을 연구하고 있다. 생명현상의 기본이 되는 DNA 대사과정(복제, 전사, 손상복구, 재조합)들과 이러한 대사과정의 기저에 깔려 있는 크로마틴 동역학에 대한 연구부터 막단백질에 대한 연구, 세포 내에서의 생체분자 이미징과 상전이에 대한 연구, 신경세포와 세포들 간의 상호작용 등 분자수준에서 살아있는 세포까지 폭넓은 분야에 대한 세계적인 수준의 연구가 진행되고 있다. 그러나 단분자 분광학의 선두그룹을 형성하는 미국과 유럽의 실험실들에 비해서, 국내 연구그룹들은 여전히 물질-인적 자원이 부족하며 인프라 형성도 낮은 수준이다. 이를 뒷받침하는 것이 국내 단분자 분광학 실험실의 절반이 서울대학교와 과학기술원들에 몰려 있다는 것이다. 그 이유는 우선 단분자 분광학 기술은 최첨단 장비들을 필요로 한다. 단일 형광체를 이미징하기 위한 고성능 CCD 및 형광현미경 등, 장치를 설치하는 초기 비용이 높기 때문에, 이를 지원해 줄 수 있는 대학 및 연구소가 드물다. 또한, 단분자 이미징은 물리 혹은 화학적 기법을 바탕으로 생명현상을 탐구하는 것이기에 물리, 화학, 생물학, 나노기술 등의 여러 학문의 융합이 필요하다. 이러한 융합 교육을 지원할 수 있는 대학교와 연구소도 국내에 많지 않다. 따라서 새로운 생명현상 탐구의 최전선에 있는 단분자 분광학의 발전을 위해서 보다 많은 투자와 지원이 필요하다.

REFERENCES

- [23] C. Cho, J. Jang, Y. J. Kang, H. Watanabe, T. Uchihashi, S. J. Kim *et al.*, Nat. Commun. **10**, 5764 (2019).