

Bio-AFM 기술의 최근 동향과 전망



글 · 부 두 완/연세대학교 화학과, 교수
e-mail · dwbboo@yonsei.ac.kr

이 글에서는 단일분자 수준에서 생명현상을 규명하는 연구에 활용되고 있는 AFM 기술에 대하여 최근의 연구 동향과 앞으로의 전망을 소개한다.

20여 년 전에 주사터널링현미경(STM)과 원자힘현미경(AFM) 기술이 개발됨으로써 원자나 분자가 더 이상 추상적인 존재가 아니라 공간상에서 특정 위치를 차지하고 실제로 구분되어 관측될 수 있는 개체로서 새롭게 인식되게 되었다. 특히 AFM 기술은 시료의 종류 및 주변 환경에 관계없이 적용될 수 있기 때문에 용액상태에서의 화학 및 생물학 현상을 연구하는 데 많이 활용되고 있다. 이 글에서는 다양한 AFM 기술들 중에서 생리 조건 하에서의 생체분자(단백질, 핵산, 지질, 탄수화물) 및 이들의 복합체 그리고 단일 세포 등 생체시스템에 대한 AFM 연구에 초점을 맞추고자 한다.

AFM의 기본 원리는 캔틸레버에 부착된 뾰족한 탐침과 시료 사이의 인력 또는 척력에 의해 캔틸레버가 휘어지게 되고 이 휘어짐의 정도를 탐지함으로써 시료의 높낮이를 인식하며, 평면상 탐침 또는 시료의 위치(x,y)를 미세하게 바꿔주면서 높낮이(z)에 대한 정보를 모아 시료표면에 대한 지형도(x,y,z)를 결정하는 것이다. AFM 작동 방식으로는 탐침과 시료를 근거리로 접촉시켜 탐침-시료간 척력을 이용하는 접촉(contact) 방식, 원거리의 인력을 이용하는 비접촉(non-contact) 방식 그리고 탐침의 상하 진동운동을 이용하는 탭핑(tapping) 또는 간헐적접촉(intermittent contact) 방식 등이 있다. 접촉방식은 공간해상도가 높다는 장점을 가

지고 있지만 주사시 끌리는 힘에 의하여 시료의 손상을 야기할 수 있는 단점을 가지고 있는 반면에, 비접촉 방식은 시료의 손상은 작지만 공간해상도가 낮다는 단점을 가지고 있다. 따라서 접촉방식과 비접촉 방식의 단점을 보완하여 높은 공간해상도를 유지하면서 상대적으로 시료의 손상이 적은 탭핑 방식이 현재 많이 활용되고 있다.

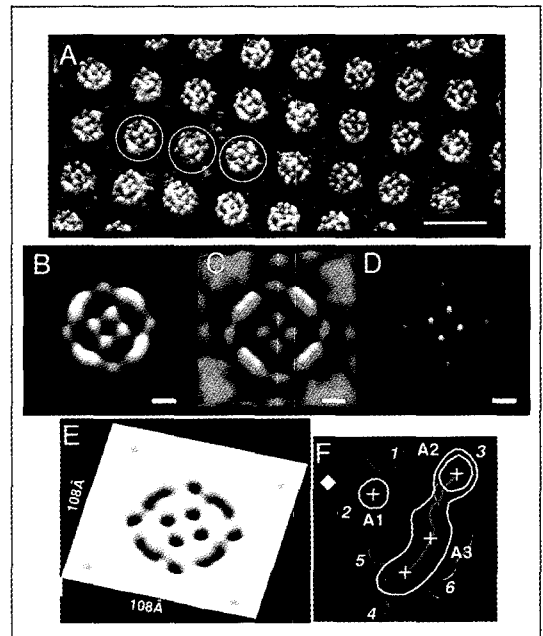
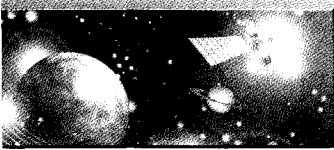


그림 1 (A) 아쿠아포린-Z 2D 결정의 AFM 이미지(선-10nm) (B) 단일 단백질 분자의 평균화된 이미지(선-1nm) (C) 평균화된 이미지의 표준편차 지도 (D) 위치 확률 지도(선-1nm) (E) 자유에너지 조망 (F) 단백질의 원자모델과의 비교



대부분의 생체시스템들은 국소환경의 변화 그리고 열, 힘 등 외부 자극에 의해 3차원 형태 및 생물학적 활성이 쉽게 변화할 뿐만 아니라 계속적으로 움직이는 매우 무르고 유동적인 특징을 가지고 있다. 따라서 최근의 Bio-AFM 연구 방향은 AFM 탐침에 의한 생체시스템의 손상을 최소화하면서 단일 생체분자의 세부구조까지도 관측할 수 있도록 공간해상도와 선명도(contrast)를 극대화하고, 생체분자의 운동을 실시간에서 관측할 수 있도록 이미징 속도를 최대화하는 연구와, 시료의 표면뿐만 아니라 내부를 3차원적으로 형상화하거나 생체분자의 특이적 상호작용을 단일 분자 수준에서 측정하는 연구 등으로 초점이 맞추어지고 있다. 이 글에서는 고해상도 이미징, 고감도 이미징, 초고속 이미징, 3차원 이미징 그리고 분자인지힘 현미경 기술 등 다섯 항목에 대하여 소개하고자 한다.

고해상도 이미징

AFM 탐침의 크기를 약 1nm 수준까지 최소화하고 스캐너의 정확도를 향상시킴과 동시에 힘 상수(force constant)가 작은 캔틸레버와 완화된 z-피드백 조건을 사용함으로써 시료의 손상을 최소화하고 접촉방식을 사용하여 공간해상도를 극대화하였다. 그림 1은 아쿠아포린-Z(aquaporin-Z) 세포막 단백질의 2차원 결정에 대한 AFM 이미지이다. 약 5nm 크기의 단백질 분자들을 형상화할 수 있었고(A), 단일 단백질 분자 내 세부구조의 공간상 분포를 결정할 수 있었으며(B, C, D), 이로부터 자유에너지 조망(free energy landscape)을 계산할 수 있었다(E). 현재 생체분자의 고해상도 이미징 기술은 생체분자의 원자구조 모델과 비교할 수 있는 단계까

지 이르러 있다(F).

고감도 이미징

탭핑기술은 탐침과 시료간의 상호작용에 의해서 발생하는 캔틸레버의 진동운동의 변화, 즉 진폭(amplitude), 주파수(frequency), 위상(phase)의 변화를 검출함으로써 형상을 이미징하는 기능과 시료의 특성을 측정하는 동적힘 현미경(dynamic force microscopy)의 기능을 동시에 갖는다. 일반적인 탭핑방식에서는 액체 중에서의 캔틸레버의 진동운동이 공기 중과는 달리 액체의 제동(damping) 작용에 의해 제약을 받기 때문에 Q 값(Q-factor)이 작고 탐침과 시료간의 상호작용의 미세한 변화를 민감하게 탐지하지 못한다(그림 2-A). 이를 개선하기 위하여 최근에는 액체의 제동힘(damping force)과 반대로 작용하는 힘의 성분을 캔틸레버 구동변환기(drive transducer)에 입력시켜 알짜 Q 값

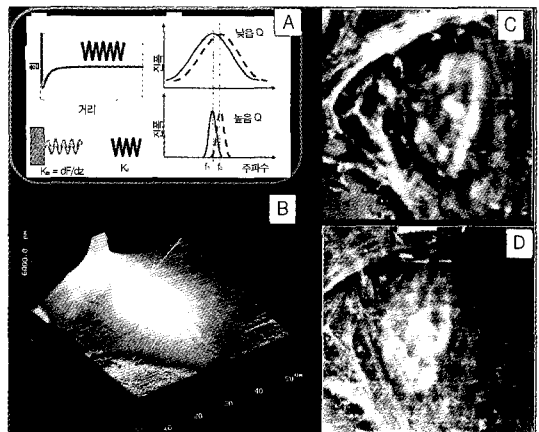
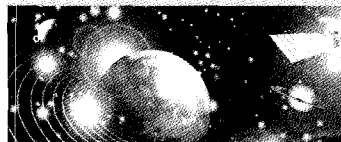


그림 2 (A) 능동적 Q-제어 원리 (B) 쥐의 살아 있는 신장세포의 AFM 이미지 (C) Q-제어 없이 얻은 확대된 이미지(B의 화살표 부분) (D) Q-제어를 사용하여 얻은 이미지



을 높이는 능동적 Q-제어(active Q-control) 방식을 도입하고 있다. Q 값이 큰 탭핑 기술을 사용함으로써 생체시료의 손상을 최소화하고 공간해상도와 선명도를 획기적으로 높일 수 있다. 그림 2-B는 쥐의 살아 있는 신장세포의 탭핑 이미지를 보여주고 있고, 화살표 부분을 확대하여 Q-제어 없이(C) 그리고 Q-제어를 사용하여(D) 얻은 이미지를 비교해보면 Q-제어를 사용할 때 세포표면의 섬유구조(filamentous network) 구조를 자세히 형상화할 수 있음을 알 수 있다. 특히 Q-값이 작을 경우에는 시표 표면에 미치는 탐침에 의한 자극을 제어하기가 어렵기 때문에 섬유조직이 깨어지는 예들이 보고되고 있다.

고속 이미징

생물학적인 활성을 가진 생체분자들은 정지해 있는 것이 아니고 주변 환경의 변화에 따라 또는 기질과의 반응을 통하여 형태와 공간상의 위치가 빠른 속도로 바뀌게 된다. 이와 같은 동적인 생체분자 또는 살아있는 세포의 신속한 움직임을 연구하기 위하여 고속 이미징 기술이 개발되고 있다. 탭핑방식을 이용한 고속 이미징 기술의 핵심요소들을 살펴보면, 첫째 캔틸레버의 고속 진동운동을 유도하기 위해서는 캔틸레버의 공명주파수가 높아야 하고 생체시료의 손상을 최소화하기 위해서는 캔틸레버의 힘상수가 작아야 한다. 따라서 길이가 짧고 얇고 폭이 작은 캔틸레버를 사용한다. 둘째, 주사시간을 단축하기 위하여 공명주파수가 높은 압전(piezoelectric) 스캐너를 사용한다. 셋째, 빠른 속도로 탐침-시료의 거리를 제어할 수 있는 고속 피드백 회로 등 고속 전자 제어 장치가 필요하다. 넷째, 3

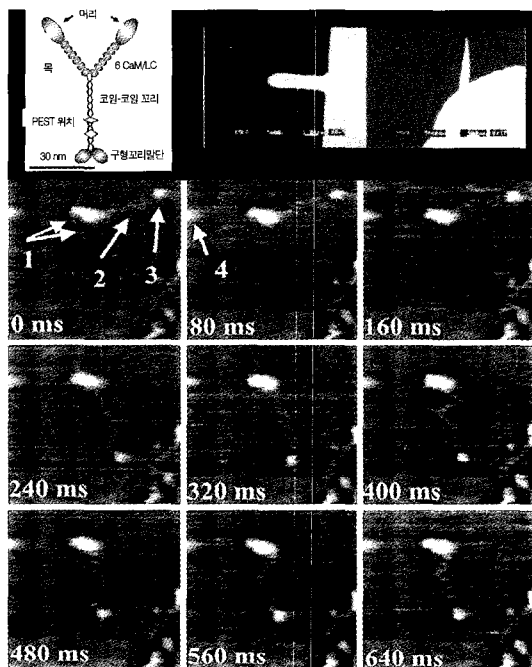


그림 3 미오신-V 분자에 대한 고속 이미징 결과: (상-좌) 미오신 V의 구조, (상-우) 사용된 캔틸레버와 탐침의 전자현미경 사진, (하) 80ms마다 얻은 240x240nm² 영역의 AFM 이미지

차원 이미지 정보를 신속하게 처리하여 디스플레이할 수 있는 고속 이미지 분석 기술 등이 필요하다.

그림 3은 공명주파수가 약 500kHz인 캔틸레버를 이용한 고속 이미징 실험의 예를 보여주고 있다. 완충용액 하에서 석영기판 위에 흡착된 미오신 V(myosin V)에 대하여 240x240nm² 영역을 80ms 간격으로 형상을 이미징한 결과를 보여주고 있다. 미오신의 꼬리 부분(2,3)이 머리-넥 부분(1)에 대하여 크고 신속한 움직임을 보인 후 느리게 움직이고 있음을 보여주고 있다. 앞으로 살아 있는 세포표면에 있는 생체분자들의 움직임을 실시간에서 관측할 수 있을 것으로 본다.

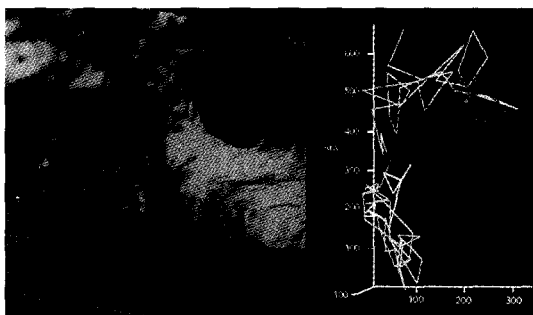


그림 4 (좌) 한천(agar) 내부의 3D PFM 이미지 (우) 트랩퍼 텐셜 내에서의 구슬의 열적요동에 의한 궤도

3차원 이미징

캔틸레버를 이용한 AFM 기술의 한계를 극복하여 2차원 표면뿐만 아니라 3차원 부피, 즉 시료 내부를 이미징할 수 있는 3차원 AFM 기술에 대한 연구가 시도되고 있다. 광자힘현미경(PFM : Photonic Force Microscopy)이라고 불리는 3차원 AFM 기술에서는 힘 센서로서 캔틸레버 대신에 레이저빔에 의한 3차원 트랩퍼텐셜(trapping potential)을, 그리고 뾰족한 AFM 탐침 대신에 나노구슬(nano bead) 또는 마이크로구슬(micro bead)을 사용한다. 트랩퍼텐셜의 강도와 형태는 구슬과 주변유체의 굴절률 차이, 구슬의 크기, 그리고 레이저빔의 세기와 3차원 모양 등에 의해서 결정된다. 일반적으로 PFM에 사용되는 힘상수는 캔틸레버에 비해 100배 이상 작으며, 1pN/nm 이하이다. 시료와 구슬 사이에 작용하는 힘의 크기와 방향은 트랩퍼텐셜 내에서의 구슬의 위치를 탐지함으로써 수 마이크로초 이내에 신속하게 결정할 수 있다. PFM의 공간해상도는 구슬과 시료간에 상호작용하는 영역의 크기와 트랩퍼텐셜 내에서의 구슬의 열적요동에 의해서 결정된다. 최근에는 열적요동을 일종

의 무작위 주사 발생기(random scan generator)로서 사용하여 폴리머 네트워크 내부에 대한 3차원 이미지를 얻을 수 있었다.(그림 4)

분자인지힘 현미경

앞에서 언급한 Bio-AFM 기술들은 주로 생체분자 또는 세포의 형상을 이미징하는 데 초점을 맞추고 있는 반면에, 분자인지힘 현미경(MRFM : Molecular Recognition Force Microscopy) 기술은 생체분자의 활성, 즉 생체분자의 고유한 특이적 상호작용을 연구하는데 이용되고 있다. 동일한 생체분자 이더라도 주변 환경 및 주기에 따라 활성의 정도가 다르기 때문에 단순한 형상 이미징을 통하여 얻을 수 없는 생체분자 개개의 특성에 대한 정보를 준다는 점에서 MRFM 기술의 중요성이 있다고 본다. MRFM 탐침은 대상 생체분자와 특이적 상호작용을 하는 생체분자를 적당한 길이의 링커분자와 결합한 후 AFM 탐침표면에 고정화하여 제조한다. 링커분자의 역할은 생체분자들이 원활히 결합할 수 있도록 입체적인 유연성과 시료-탐침간의 비특이적 상호작용에 의한 간섭을 최소화하는 것이다. 그림 5의 카툰에서 보여주듯이 MRFM 기술은 일종의 '분자 낚시질'에 비유될 수 있는데 일단 시료와 탐침을 접촉시켜 생체분자간 선택적 결합을 유도한 후에 탐침을 일정한 속도로 후퇴시키면서 힘-거리 곡선을 측정하게 된다. 이 때 생체분자간 상호작용의 세기는 힘-거리 곡선에서 해리될 때 생기는 피크의 깊이로서 나타내며 비결합힘(unbinding force)이라고도 부른다.(그림 5)

MRFM 기술을 이용한 연구의 예들을 살펴

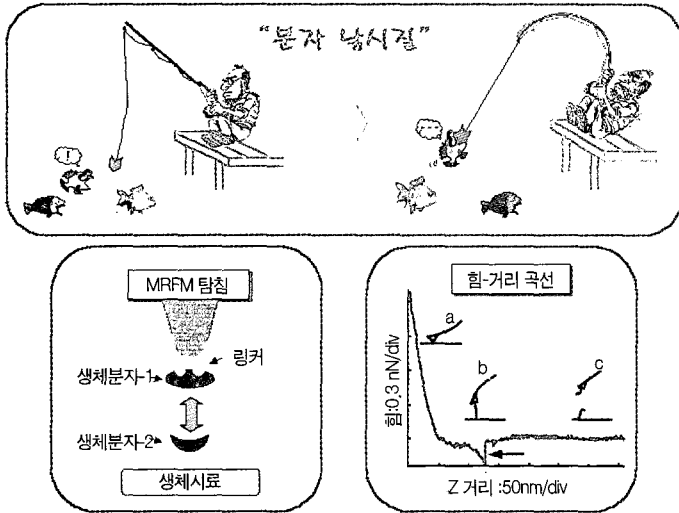
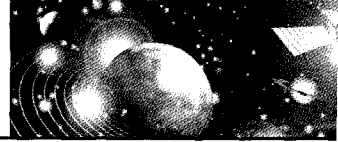


그림 5 MRFM 기술의 원리: (상) MRFM의 개념 카툰 (하-좌) MRFM 탐침의 구조 (하-우) 힘-거리 곡선의 예

보면, 첫째 탐침의 후퇴속도에 따른 비결합 힘을 측정함으로써 생체분자의 상호작용에 대한 에너지 조망을 결정하는 연구를 들 수 있다. 최대 확률을 갖는 비결합힘과 탐침 후퇴속도의 로그값 사이의 일차함수 관계식으로부터 해리과정에 대한 전이상태의 위치와 에너지 장벽(energy barrier)에 대한 정보를 얻거나 또는 무수히 반복적으로 얻어진 힘-거리 곡선으로부터 거리에 따른 일(work)을 계산하고 이를 지수 함수적으로 평균화함으로써 해리과정 전반에 대한 에너지 프로파일을 결정할 수 있다.

둘째, 분자유전학적으로 생체분자의 일정부분을 조작하여 돌연변이체를 발현시킨 후 원형과 돌연변이체의 힘-거리 곡선을 비교함으로써 생체분자의 특이적 상호작용의 본질을 규명하는 연구를 들 수 있다. 그림 6A의 티틴(titin) 단백질에 대한 MRFM 연구 결과에 따르면 티틴 단백질을 구성하고 있는 면역글

로블린 : (IG:Immunoglobulin) 도메인의 여섯 번째 아미노산인 라이신(lysine)을 프롤린(proline)으로 변형할 경우 힘-거리 곡선 상에서 A와 B 가닥(strand) 간에 존재하는 두 개의 수소결합에 해당하는 부분이 사라짐을 알 수 있다. 이들 수소결합들이 IG 도메인 형성에 중요한 역할을 하며 이들이 해리된 후에 IG 도메인이 전체적으로 풀림을 알 수 있다. 그림 6B는 항원(플로로세인)과 항체(scFv) 간 특이적 상호작용에 대한 MRFM 결과를 보여주고 있

다. 항체의 58번째 아미노산인 히스티딘을 알라닌으로 변형시킨 후 비결합힘을 측정할 결과 특이적 상호작용의 세기가 원형 단백질에 비해 20% 정도 감소하였음을 보여주고 있다. 이는 히스티딘이 항원-항체 결합에 참여하고 있는 아미노산임을 알 수 있다.

셋째, 본 연구실에서 수행되고 있는 연구로서 시료와 특이적인 상호작용을 보이는 생체분자를 이용하여 MRFM 탐침을 제조하고 이를 이용하여 세포표면 또는 나노바이오칩 상에 존재하는 특정 생체분자들의 분포와 개수를 단분자 수준에서 검출하는 연구를 들 수 있다. 현재 세포표면에 존재하는 탄수화물들을 탄수화물과 특이적 상호작용을 하는 렉틴(lectin) 단백질을 이용한 MRFM 탐침을 사용하여 검출하는 연구가 진행되고 있으며 앞으로 유사한 연구가 세포표면에 존재하는 세포막 단백질에 대해서도 진행될 예정이다.

위에서 언급한 최근의 Bio-AFM 연구의

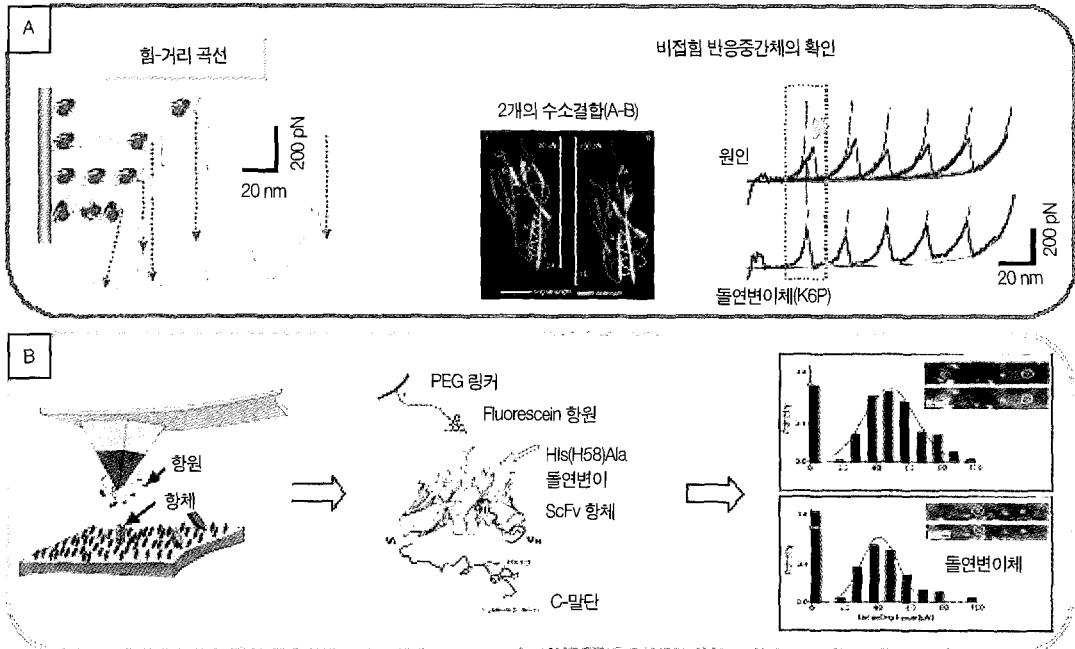
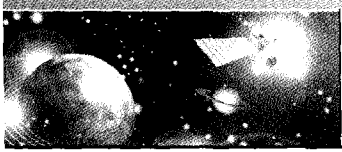


그림 6 (A) 티닌 단백질의 폴리머화에 대한 MRFM 결과: 원형과 돌연변이 단백질의 비교 (B) 플로로세인 항원과 scFv 항체간의 MRFM 결과: 원형과 돌연변이 단백질의 비교

동향으로부터 앞으로의 Bio-AFM 기술의 연구방향을 전망해본다면, 첫째 고해상도, 고감도 및 고속 이미징 기술과 MRFM 기술이 접목된 고속 분자인지 이미징 기술의 개발을 들 수 있다. 이를 이용하여 살아있는 세포표면에 있는 생체분자들의 분포 및 구조변화, 이동 및 반응 등을 실시간에서 그리고 단분자 수준에서 선택적으로 측정하는 연구를 수행할 수 있을 것이다. 둘째 3차원 AFM 기술에 대한 연구가 지속될 것으로 본다. 나노구슬을 이용한 주사방식을 개선하고 공간해상도를 높일

경우 살아 있는 세포 내부의 3차원 이미징도 가능하리라 본다. 셋째 탐침-시료간 힘을 이용하는 AFM 기술과, 전기, 자기, 열 및 광 특성을 이용한 다양한 탐침 기술이 접목된 하이브리드 Bio-AFM 기술이 구현될 것으로 본다. 이를 이용하여 하나의 생체시스템에 대하여 여러 가지 특성을 동시에 측정하여 생체분자의 다양한 측면을 이해함으로써 생명현상의 본질을 규명하는 데 기여할 수 있을 것으로 본다.