

## 고자기장 NMR을 활용한 단백질 구조연구

김은희, 전영호  
한국기초과학지원연구원 자기공명연구부

### 1. 서론

사람 몸에 병이 생기는 것은 많은 원인에 의해 단백질들이 정상적으로 기능을 수행하지 못하거나 과하게 활동하는 경우, 또는 외부에서 침입한 미생물의 활동에 의한 것이다. 질병치료를 위해 인간 유전체 내의 단백질 기능을 조절하거나, 미생물 침입자의 단백질의 기능을 억제하는 방법이 있다. 즉 특정 단백질의 활성 부위에 결합하여, 단백질의 기능을 억제하는 치료제를 개발할 수 있다. 우리가 단백질의 기능과 모양을 좀 더 자세하게 관측할 수 있다면, 우리의 생명을 위협하는 질병, 노화, 기능부전 등으로부터 해방되어 건강한 삶을 기대할 수 있다.

단백질의 모양과 움직임을 원자 수준의 고분해능으로 규명하는 방법은 핵자기공명법(NMR spectroscopy)과 X-선 회절분석법(X-ray crystallography)이 있다. 그 중에서 NMR을 이용한 단백질 구조 연구는 주로 저분자량 단백질들을 중심으로 이루어져 왔다. 최근에 NMR 기술의 발전으로 분자량의 한계가 점점 높아지는 추세이다. 이러한 기술적 발전에 힘입어 NMR을 이용한 상호작용 연구 및 막단백질 연구도 활발히 시도되기 시작하였다. 본 특집에서는 고자기장 NMR을 활용한 연구법 및 관련 기술 그리고 단백질 구조연구 동향을 소개하고자 한다.

### 2. NMR을 이용한 단백질 구조연구의 방법과 특징

X-ray 회절분석법은 단결정 단백질 내부의 원자위치를 사진을 찍는 것처럼 직접 결정하는 것과 달리, NMR 분석법은 단백질 내부의 각 수소 원자 간의 거리를 실험으로 측정하고 이를 컴퓨터를 이용하여 계산하여 단백질의 삼차원 구조를 계산할 수 있다. 단백질의 NMR 실험을 용이하게 진행하기 위

해 단백질을 일반적인  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ 이 아닌 안정된 동위원소인  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ 으로 표지해야 한다. 이 과정은 대장균을 이용한 단백질 발현 시 배지 내 영양소를  $^{13}\text{C}$ 표지된 포도당과  $^{15}\text{N}$ 표지된  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 를 사용하면 된다.

NMR 실험법과 X-선 회절분석법과 비교해 보면, NMR은 수용액상에서 실험이 진행되므로 결정화와 같은 과정을 거치지 않고, 단백질을 좀 더 생리 상태와 유사한 환경 하에서 연구할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 NMR은 X-선 회절분석법에 비해 연구 가능한 단백질의 크기에 제한이 있다는 큰 단점이 있다. X-선 회절분석법은 결정화만 성공하면 어떠한 크기의 단백질도 구조연구가 가능하지만 NMR은 단백질의 크기가 커지면 수소원자의 숫자도 증가하여 서로 구별 및 분석하기 어려워지고 동시에 단백질의 운동성이 느려져 신호 감도가 급격하게 감소하는 등 구조분석의 어려움이 있다. 이와 같은 문제를 해결하기 위해 고자기장 NMR의 개발, cryogenic probe의 개발, TROSY NMR 실험 기법의 개발, 중수소화(deuteration)된 단백질 사용 등 다양한 시도를 하고 있다.

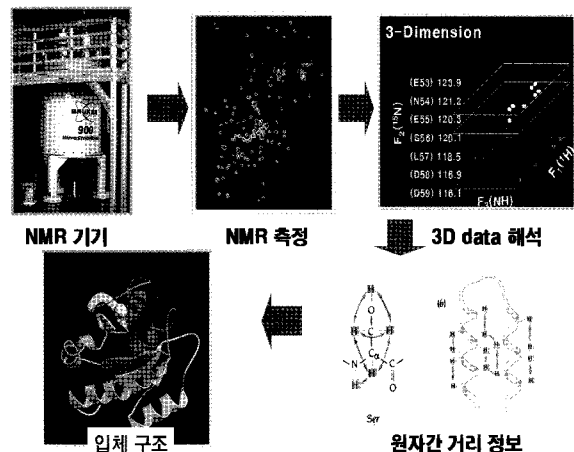


그림 1. NMR을 이용한 단백질의 구조구명 방법.

### 3. 고분자량 단백질 구조 연구를 위한 최신 NMR 기술

#### 3.1 Hardware approach

##### - Ultra High field magnet

분자량 2만이상의 단백질 입체구조를 NMR로 정확히 규명하려면 보통 6개월 정도의 NMR 실험 기간이 필요하다. 이러한 장시간 장비사용 문제는 NMR 장비가 가지는 낮은 신호 민감도와 단백질의 크기가 커짐에 따른 고해상도의 데이터가 구조분석에 중요하기 때문이다. 또한 NMR 실험을 위해 1mM이상의 고농도의 단백질 시료 준비는 NMR 연구를 어렵게 만드는 주요한 문제이다. 그러나 이 문제는 초고자장의 초전도 자석을 이용 시 극복할 수 있다. 1990년대 후반에는 500 MHz 와 600 MHz의 초전도 자석이 주로 사용되어 왔고, 1997년 이후 750 MHz 이상의 고자장 초전도 자석이 도입되기 시작했다.

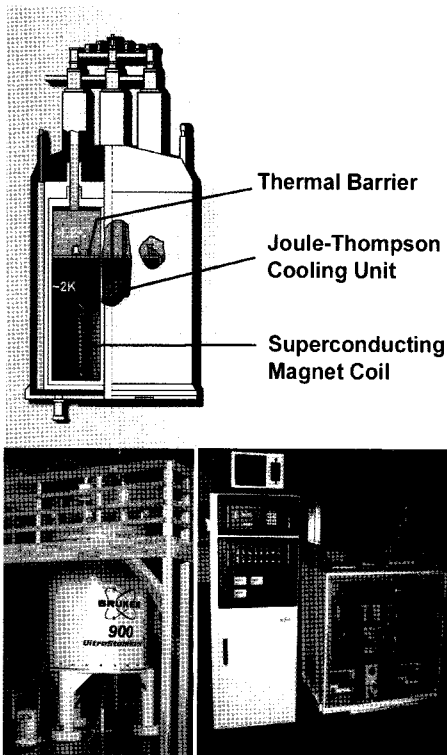


그림 2. 고자장 NMR 자석 단면도(위)와 기초(연)에 설치된 900 MHz NMR과 헬륨펌프(아래).

2000년부터 초고자장인 900 MHz 초전도 자석이 성공적으로 개발되어 우리나라에도 2005년 2대의 900 MHz NMR이 도입되었다 (KBSI, KIST). 900 MHz NMR은 신호감도는 500 MHz에 비해 4-5배 정도의 향상을 기대할 수 있으며 해상도는 2배 이상 좋아진다. 따라서 단시간의 실험과 적은 량의 단백질로도 충분한 실험을 할 수 있고 이는 신속한 단백질 구조연구를 위한 가장 중요한 요소이다. 2009년 현재 Bruker-BioSpin(독일)사에서 1 GHz NMR을 성공적으로 개발하여 설치 중이며, 이에 힘입어 NMR을 활용한 단백질 연구가 보다 진일보 할 것으로 예상된다.

##### - Cryogenic probehead

Cryogenic probehead는 NMR probe의 RF-coil의 온도를 15~30K 정도로 극저온 상태로 냉각하여 coil의 열 저항을 감소시켜 배경 신호감도를 4-5배 정도 향상시킨 특수 장비이다. Cryogenic probehead 활용 시 장점은 적은 양의 시료로도 실험이 가능하고 실험시간을 단축시킬 수 있어 안정성이 낮은 시료의 경우도 실험결과 획득이 가능하다는 것이다. 일반 probehead 사용 시 약 8주 정도 소요되는 3차원 실험을 cryoprobe를 사용 시에는 1주 정도 소요되므로 8배의 시간단축 효과가 있어 cryogenic probehead를 통한 High-throughput NMR 실험이 가능하다.



그림 3. 900 MHz NMR에 설치된 ATM-TCI Cryogenic probehead.

### 3.2. Sample approach

#### - 아미노산 특이적 labeling

단백질의 분자량이 커질수록 NMR의 수도 신호가 많아지므로, 신호의 겹침이 더욱 심해져서 data 해석이 어려워진다. 단백질은 20 종의 아미노산으로 이루어져 있으므로, 각 아미노산의 신호를 선택적으로 관측할 수 있다면, NMR 신호의 겹침 문제를 많이 해결할 수 있다. 따라서  $^{15}\text{N}$  이나  $^{13}\text{C}$  동위원소로 표지된 특정 아미노산을 사용하여, 간소화된 신호를 해석하는 것이 용이한데, 문제는 특정 아미노산을 사용하더라도, 대사 과정을 통하여 다른 종류의 아미노산도 표지되는 경우가 많다. 이를 억제하기 위하여  $\beta$ -alanine 등 대사과정의 억제제를 사용하거나, 특정 아미노산을 생산 못하도록 변이를 일으킨 auxotroph 균주를 사용하기도 한다.

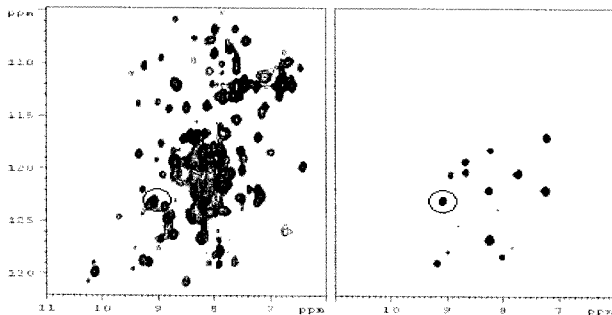


그림 4. 아미노산 특이적 표지효과. (좌) 단백질 일반 스펙트럼과 (우)알라닌(alanine) 아미노산만을  $^{15}\text{N}$ 으로 표지한 스펙트럼 비교.

#### - 중수소 치환

단백질의 분자량 한계를 극복하기 위하여, 가장 많이 시도되는 방법 중의 하나가 deuteration (중수소 치환)이다. 이것은 단백질을 구성하는 수소원자 중 관측하고자 하는 수소원자를 제외하고, 나머지를 중수소로 치환하여 관측하고자 하는 수소원자 신호의 감도를 개선하는 것이다. 이것은 신호의 감도(sensitivity) 뿐 아니라, 선풍 감소로 인한 분해능(resolution)도 개선된다.

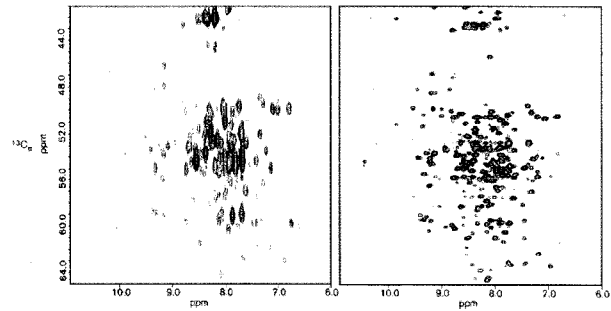


그림 5. 중수소 치환 전(좌)과 중수소 치환 후(우)의 단백질의 HSQC 스펙트럼 비교 시 해상도가 현저히 증가함.

이를 위하여 단백질을 생산할 때에 대장균을 중수( $\text{D}_2\text{O}$ )에서 배양함으로써, 대장균이 발현하는 단백질이 중수소로 치환되도록 하는 방법을 사용한다. 그러나 일반적으로 사용하는 M9 최소화 배지(minimal medium)에는 탄소원(carbon source)로 glucose를 사용하므로, glucose도 중수소로 치환된 glucose를 사용해야 한다. 보통은 탄소도  $^{13}\text{C}$ 로 치환하므로,  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$ -glucose를 사용하게 되는데, 이 가격이 만만치 않다. 일반  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -glucose를 사용할 경우는 100%  $\text{D}_2\text{O}$ 에서 배양할 경우 약 70%의 수소원자가 중수소로 치환되는 것으로 알려져 있다. 70% 정도만 치환하더라도, 남아있는 수소원자의 relaxation 억제 효과는 현저하다. 일반적으로, 배양은 중수( $\text{D}_2\text{O}$ )에서 하고, 정제 샘플은 일반  $\text{H}_2\text{O}$ 로 만든 완충용액을 사용하여, back-protonation에 의해 수소원자로 치환 가능한 NH 수소에 대하여 관측한다.

#### - Stereo-Array Isotope Labeling(SAIL)

이 방법은 chiral 유기 합성으로  $^{13}\text{C}$ 와  $^{15}\text{N}$ 이 enrich 되어 있으면서, methylene기의  $^1\text{H}$  한 개를  $^2\text{H}$  (deuterium)로, 입체 선택적으로 치환하여 methyl 기의  $^1\text{H}$  두 개를  $^2\text{H}$ 로, Leu, Val의 prochiral methyl group을 한 methyl은 3개의  $^2\text{H}$ , 나머지 한 methyl은 한 개의  $^1\text{H}$  과 두 개의  $^2\text{H}$ 로 입체 선택적으로 치환하는 방법이다. 이렇게 만든 아미노산으로 단백질을 발현, 정제하여 NMR 실험을 하면, 단백질을 구성하는 수소 원자의 수가 대폭 감소하여, NMR 신호가 훨씬 간소해지고, 감도가 증가하며, 해상도가 증가한다.

Kainosho 등은 이 방법을 적용하여 분자량 45,000의 단백질의 구조 계산 전체를 자동으로 규명하는데 성공하였다. 이 방법을 사용하면, 현재 단백질 구조 규명에 있어서, 분자량의 한계를 획기적으로 (약 2배 이상) 극복할 수 있다는 주장이다. 한 가지 단점은, SAIL 아미노산의 가격이 매우 비싸다는 점이다.

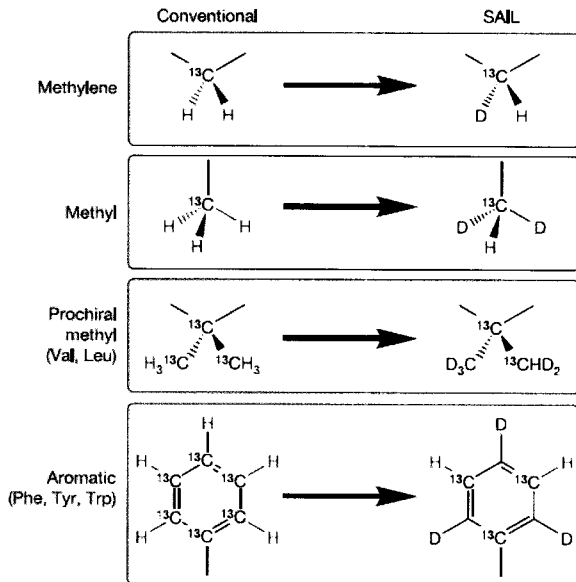


그림 6. SAIL아미노산의 design.

-  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -methyl-selective [U- $2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] 치환 단백질 합성

단백질의 3차원 구조를 계산하기 위해서는 수소 원자간의 거리정보를 NOE라는 현상을 통해서 관측하여 사용하는데, 중수소로 치환된 단백질을 사용하면, 이러한 side chain NOE의 사용이 불가능해진다. 이러한 단점을 극복하고, 거대분자의 NMR신호를 관측하기 위하여, L. Kay 등은 특정 alpha-keto acid를 도입하여, Leu, Ile, Val 등의 methyl 기를 protonation 시키고, 나머지 모든 수소를 중수소로 치환하는 방법을 사용하였다. 이것은 ① methyl proton들이 relaxation 이 느리고, 신호가 다른 수소에 비해서 현저히 높은 감도를 보인다는 사실과 ② methyl group이 주로 단백질 내부의 hydrophobic core에 존재하여, methyl proton간의 거리정보가 3차원 구조 계산에 유용한 정보를 제공

하는 것, ③ methyl 기가 단백질의 운동성을 나타내기 좋은 reporter라는 것, 그리고 ④ methyl 기를 효과적으로 protonation 하고, 다른 수소는 중수소로 치환하는 방법이 가능하다는 등의 이유로, side chain 신호를 모두 assign하기 어려운 고분자량 단백질의 3차원 구조를 얻기 위한 대안으로 제시되고 있다.

### 3.3. 실험기법 approach

- TROSY 기법 적용

단백질의 크기가 커지면 단백질 내에 수소 원자가 많아지고 또 수용액상에서 단백질의 회전운동이 느려져 NMR 신호 관측을 위해 공급한 에너지를 짧은 시간 내에 급격히 잃어버려 NMR실험이 불가능해진다. 또한 신호의 선폭도 넓어져 해상도가 낮아져 스펙트럼의 해석을 불가능하다. 2002년 노벨화학상을 수상한 Kurt Wuthrich 그룹에서 1997년 TROSY 기법이 발표되면서 신호가 NMR 관측시간 동안 충분히 유지되게 해 감도를 향상시키고, 동시에 선폭을 보다 좁게 만들어 높은 해상도를 얻을 수 있다.

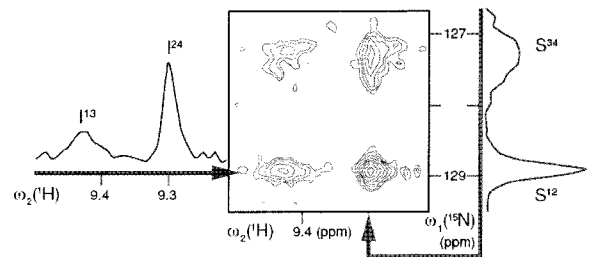


그림 7. TROSY 실험의 원리를 나타내는 스펙트럼. 고분자량 단백질의 통상적인  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  correlation 스펙트럼을 decoupling 없이 측정 한 것.

특히 TROSY 기법은 1 GHz 근처에서 최고의 효과를 보이므로 초고자장에서 도입할 경우 더 큰 효과를 볼 수 있다. 이론적으로는 TROSY는 10만 이상까지 적용할 수 있고 10만이면 대부분의 단백질의 크기를 포함하므로 TROSY 기법을 통해 NMR의 크기 제한은 실질적으로 극복 되었다고 볼 수 있다. 또한 TROSY는 micelle 상태로 용해된 막단백질과 같이 단백질 자체의 분자량이 크지

않더라도 micelle로 인해 tumbling time이 상당히 커진 경우에도 적용이 가능하므로 막단백질에 대한 구조결정에 새로운 가능성을 열어주고 있다.

#### 4. 국내 NMR 장비 인프라 현황

국내에 설치되어 활용 중인 NMR 장비 수는 대략 200 ~ 250 기 정도이다. 주로 대학의 NMR 전문 연구실 및 공동실험실습관에 다수의 NMR 장비가 설치되어 활용 중이며 한국 기초과학지원연구원(900 MHz 1기, 800 MHz NMR 1기)과 한국과학기술연구원(900 MHz 1기) 그리고 한국화학연구원(700 MHz NMR 1기)에 초고자장 NMR이 설치되어 국내 연구자들이 공동 활용하고 있다.

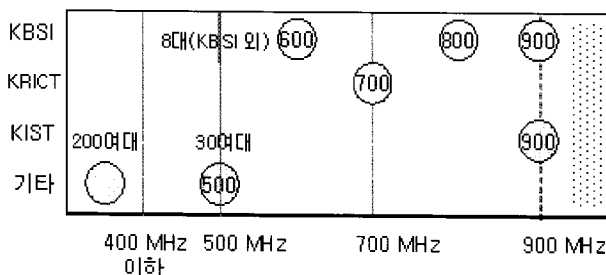


그림 8. 국내 NMR 장비 설치 현황.

#### 5. NMR을 활용한 단백질 구조연구 전망

NMR을 이용한 단백질 구조연구는 주로 결정화가 어려운 단백질에 비중을 두어 왔다. 즉 분자량이 작은 단백질의 구조 및 단백질의 운동성에 대한 연구, 그리고 단백질을 이용한 상호작용연구 등이 많은 관심을 끌고 있다. 최근에 Wuthrich 등에 의해 TROSY 기법이 개발되면서, 단백질의 분자량 한계를 극복하려는 시도가 많은 성과를 얻고 있다. 일본의 Kainosho 등이 개발한 SAIL 기법은 입체구조 특이적으로, 아미노산의 특정 proton을 중수소로 치환 함으로써, 용액 NMR에 있는 분자량한계, 신호감도가 낮은 점을 동시에 해결하는 장점이 있다. SAIL법에 의하면, NMR 신호가 대폭 간소화되어, 분자량한계를 5만 이상으로 끌어올려 signal assignment, 구조결정의 자동화에도 유리하다. 특히 RIKEN의 P. Guentert 박사가 만든 CYANA 프로그램을 사용하면, 자동

assignment, 자동구조해석을 진행하는 일도 가능하여 구조해석 속도가 빨라지고 있다. 이러한 기술적 진보를 바탕으로 막단백질 연구가 서서히 가속화되고 있는 실정이다. 막단백질의 신약 개발 연구에 있어서 큰 impact를 주므로, 많은 제약기업에서 관심이 많은 분야이다.

한편, 신약개발에 있어서, lead 화합물 탐색단계에는 약한 상호작용의 검출을 신속히 할 필요가 있다. 이런 점에서 NMR법은 우수한 방법이다. NMR flow-cell, 단백질의 고정화기술등의 개발을 통하여, 약한 상호작용 검출에 적절한 high throughput의 NMR screening법을 제공할 수 있다.

NMR을 이용한 단백질 구조연구는 X-ray와 경쟁관계에 있다기보다는 상호 보완적인 기술로서, 시너지를 얻는 방향으로 발전되어야 한다. 이를 위한 NMR 신호관측 및 assignment 기술이 지속 발전할 것으로 본다. 특히 신약 연구에 활용될 수 있는 단백질 구조 및 상호작용 연구는 고자장 NMR 장비가 기여할 수 있는 최적의 분야로서, 향후에도 많은 관심과 투자가 집중되어야 한다.

#### 참고문헌

- [1] Robert F. "Service NMR Researchers Look to the Next Generation of Machines", Science, 279, pp 1127-1128 (1998).
- [2] K. Riek et al., "Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. Proc. Natl Acad Sci USA 94, pp 12366-12371 (1997).
- [3] Garrett DS, et al., "Solution structure of the 40,000 Mr phosphoryl transfer complex between the N-terminal domain of enzyme I and HPr." Nat Struct Biol. 2, pp 166-73., (1999).
- [4] J. Cheong et al. "Study of Structural Genomics by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Biochemistry News 21, pp 271-278, (2001).

- [5] Medek A, et al. "An approach for high-throughput structure determination of proteins by NMR spectroscopy" J Biomol NMR. 18, pp 229-238.(2000).
- [6] Tzakos AG, et al., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35, pp 319 - 342 (2006).
- [7] Kainosho M. et al. "Stable isotope labeling methods for protein NMR spectroscopy", Nature ,440, pp 52-57, (2006).
- [8] Tugarinov, V., et al. "Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue Malate Synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods" J. Am. Chem. Soc. 125, pp 13868-13878 (2003).

저자이력



김은희(金銀嬉)  
충남대 생화학과(BS, 1994)  
충남대 생화학전공(MS,1996)  
현재 한국기초과학지원연구원  
선임연구원.



전영호(田榮浩)  
서울대 약대(BS, 1985)일본  
오사카대학 구조생물학(PhD.,  
1996)LG화학 기술연구원 선  
임연구원(1997~2000)크리스  
탈지노믹스(주)연구위원(2000  
~ 2005)현재 한국기초과학지  
원연구원 책임연구원, 자기공  
명연구부장.