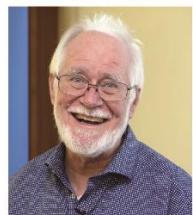
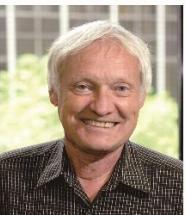


## 2017 노벨화학상

### 생화학 연구를 위한 혁명적 기술 CryoEM



jacques dubochet



joachim frank



richard henderson

2017년 노벨화학상은 생체분자의 고해상도 3차원 구조 규명을 가능케 한 “초저온 투과전자현미경 (Cryo-Electron Microscopy) 기술” 개발의 공로로 자크 뒤보셰 (Jacques Dubochet, 스위스 로잔대학교), 요하킴 프랭크 (Joachim Frank, 미국 컬럼비아대학교), 리차드 핸더슨 (Richard Henderson; 영국 의학연구위원회)에게 수여되었다. “초저온 투과전자현미경 (Cryo-Electron Microscopy) 기술”은 현재 다양한 생체분자 (단백질, RNA, DNA) 및 바이러스의 3차원 분자구조를 밝히는데 활용되고 있으며, 구조생화학 분야의 새로운 시대를 여는 혁명적 기술로 인정받고 있다.

#### 생체분자의 3차원 구조연구: 구조생화학이란?

생명체의 기본 단위인 세포 안에는 수많은 생체분자 (DNA, RNA 그리고 단백질)가 존재하며, 이들간의 복잡한 상호 작용에 의해 다양한 생명현상이 유도된다. 우리 주변의 많은 사물들이 그들만의 고유한 기능을 하기 위하여 아주 다양한 모양을 가지고 있듯이, 생체 분자들도 생명현상의 근간이 되는 그들만의 고유한 기능을 발휘하기 위하여 아주 다양한 그리고

특징적인 구조를 가지고 있다. 이러한 생체분자의 3차원 분자구조를 규명함으로써 그들의 분자적 작동메커니즘과 그에 기반한 생명현상을 이해하는 연구하는 분야가 바로 구조생화학이다.

현재까지 구조생화학 분야에서 대표적인 기술로는 X-선 결정학 (X-ray Crystallography)과 핵자기공명분광학 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance)을 꼽을 수 있다. 특히 X-선 회절이라는 물리학적 원리에 기반한 X-선 결정학은 DNA의 이중나선 구조를 밝히는데 중요한 단서를 제공하였을 뿐 아니라, 1950년대 마이오글로빈 (Myoglobin) 단백질의 3차원 분자구조를 처음으로 규명한 이래로 지금까지 단백질, 단백질-DNA 복합체, 단백질-RNA 복합체 등의 많은 생체 분자 구조의 규명에 큰 기여를 해왔다. X-선 결정학을 활용한 광합성단백질 (1988년 노벨화학상), ATP 생성단백질(1997년 노벨화학상), 포타슘 채널단백질 (2003년 노벨화학상), RNA 중합효소 (2006년 노벨화학상), 라이보좀 (2009년 노벨화학상), G-protein coupled 수용체 (2012년 노벨화학상)와 같은 생체 분자의 3차 구조 연구 결과들이 그 대표적인 사례라고 할 수 있다. 하지만 핵자기공명분광학의 경우 비교적 작은 생체 분자 구조 규명에만 활용이 가능하고, X-선 결정학의 경우 생체분자의 결정 (Crystal)이 반드시 필요하다. 이를 위해 많은 양의 순수 정제된 생체분자가 필요하고, 세포막 단백질이나 크기가 아주 큰 단백질복합체들의 3차 구조 규명에는 많은 어려움을 겪어 왔으며, 결정상태의 생체 분자는 실제 생체 내 상태와 일부 다를 수도 있어 생체분자의 다이나믹한 형태를 이해하는 데는 한계를 나타내었다. 이를 극복하기 위하여 다양한 시도들이 시도되었고 “초저온

투과전자현미경 (Cryo-Electron Microscopy) 기술” 이 바로 그 대안으로 최근 주목받기 시작하였다.

### 투과전자현미경을 활용한 구조생화학: CryoEM

20세기 초 독일 과학자 루스카 (Ernst Ruska, 1986년 노벨물리학상 수상)에 의해 개발된 투과전자현미경은 전자빔과 전자렌즈를 사용하여 얇은 시편에 있는 시료를 고배율로 확대해서 보이게 하는 영상장비이다. 투과전자현미경은 재료, 물리, 화학 등의 다양한 분야에서 활용되고 있으며, 의학이나 생물학 분야에서는 세포나 조직의 내부 미세구조를 관찰하는데 주로 활용되어 왔다.

투과전자현미경을 활용하여 생물시료를 관찰하는데 있어서는 여러 가지 근본적인 문제점이 존재한다. 투과전자현미경의 경우 전자빔의 특성상 경통 안은 항상 고진공 상태가 유지되어야 하지만, 세포 속은 수용체로 채워져 있으며 대부분의 생체 분자들은 수용액 상태에서만 안정하기에 고진공 상태에 오랫동안 머무를 수 없다. 또한 탄소, 질소, 산소, 수소로 대부분 구성된 생체분자들은 전자 산란력이 낮아 영상의 명암대비 (Contrast)가 미흡하며, 전자산란 과정에서 만들어지는 여가에너지에 의해 생체 분자들의 공유결합들이 쉽게 깨질 수 있기 때문에 강한 전자빔에 오랫동안 노출시킬 수 없다. 따라서 고정(Fixation), 탈수(Dehydration), 염색(Staining)과 같은 전처리를 통해 생물시료들의 문제점을 해결하고자 하였다. 1950년대 Negative 염색법 (증금속염으로 생체시료 염색 후 건조)을 활용하여 바이러스, 박테리오파지 등을 투과전자현미경으로 처음 관찰할 수 있었고, 1968년 아론 크로그 (Aaron Klug, 1982년 노벨화학상)는 투과전자

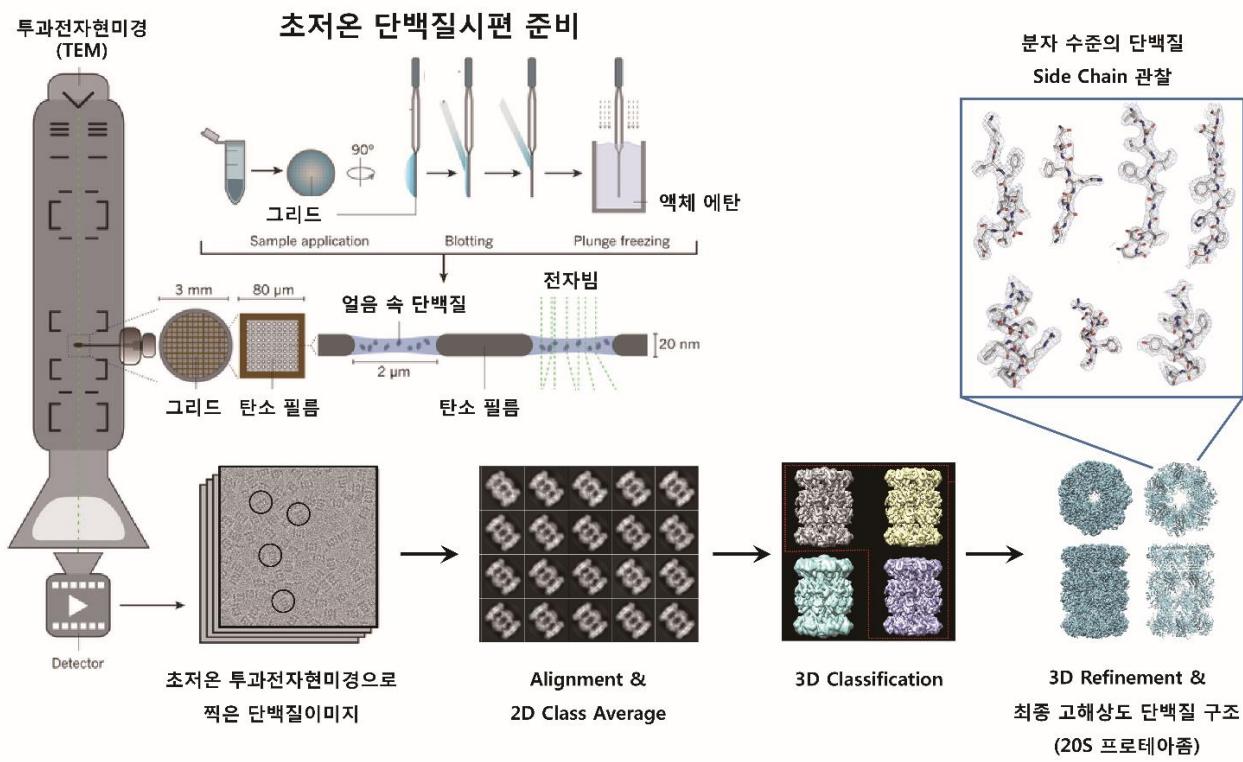
현미경의 2D 이미지 (Negative 염색법으로 준비된 시편)를 활용하여 박테리오파지의 꼬리의 3차원 분자구조를 최초로 규명하였다. 하지만, Negative 염색법의 염색과 건조 과정에서 만들어질 수 있는 생체분자의 구조적인 왜곡은 극복할 수 없었고, 실제로 관찰된 전자산란은 생체분자에 의한 신호가 아닌 생체분자를 둘러싸고 있는 염색분자에 의한 전자산란 신호가 관찰되기 때문에 염색분자의 크기에 따른 분해능의 한계를 나타내었다. 따라서, 원래 상태를 유지하면서 생체분자를 관찰할 수 있는 새로운 기술 개발의 필요성이 부각되었다.

1970년대 리차드 핸더슨 교수는 수용액을 포도당 용액으로 치환하여 세포막단백질인 박테리오로돕신이 진공상태에서도 원상태로 유지할 수 있게 한 후, 약한 에너지의 전자빔을 조사하여 다양한 각도에서 투과전자현미경 이미지를 촬영하였다. 여기에서 얻어진 투과전자현미경 이미지들과 전자회절 패턴 분석을 통하여 최종적으로 박테리오로돕신의 3차 구조를 규명하였고, 이를 통해 염색과 탈수과정 없이 생체분자 단백질의 투과전자현미경 이미지를 활용하여 분자구조 분석이 가능함을 최초로 보여주게 되었다.

이후 1980년대에 샤크 뒤보세 교수는 용액상의 단백질을 급속도로 초저온 에탄 액체 (-196도)를 사용하여 냉각시킬 경우 용액이 비정질의 유리화된 얼음 (Vitreous Ice) 상태로 변하고 그 안에 자유롭게 떠 있던 단백질 분자들은 무작위적인 방향성 (Random Orientation)으로 가두어져 보존되는 초저온 시편제작 기술을 개발하였다. 이렇게 무작위적인 방향성을 가진 채 얼려진 수십~수백만 개의 단백질 단분자들을 투과전자현미경으로 촬영한 후 단백질 단분자들 각각의 상대적 방향

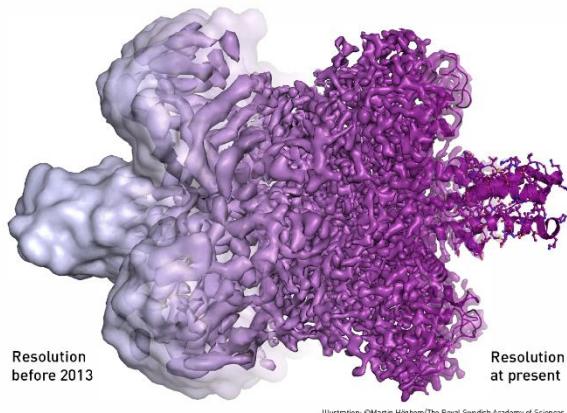
성을 분석하여 3차원으로 재구성하는 기술을 Single Particle CryoEM 이라 한다. 마치 우리가 자동차를 앞, 뒤, 옆, 위에서 찍은 사진을 가지고 자동차의 형태를 떠올릴 수 있는 것과 비슷한 맥락이다. 앞에서 언급하였던 바와 같이 단백질의 전자산란력이 매우 낮기 때문에 투과전자현미경으로부터 얻어진 단백질 단분자 이미지 하나하나에 포함되어 있는 신호들은 매우 약하다. 이와 같은 한계를 극복하기 위하여 1980년대 요하킴 프랭크 교수는 수십~수백만 개의 단백질 단분자 이미지들을 형태 별로 통계학적인 방법으로 분류하고 모양이 비슷한 단분자 이미지들끼리는 영상신호를 평균화하여 signal-to-noise ratio를 증폭시키는 2D-class

average 기법과 단백질 단분자들의 상대적 방향성을 계산하여 3차원 구조로 재구성하는 이미지 프로세싱 알고리즘을 개발하였다. 수십~수백만 개에 해당하는 단백질 이미지 빅데이터를 다루기 위하여서는 컴퓨터를 활용하는 것이 필수였기에 이러한 알고리즘을 담은 이미지 프로세스용 소프트웨어 (SPIDER; System for Processing Image Data from Electron microscopy and Related fields) 또한 개발하였다. 이와 같은 2017년 노벨화학상 수상자들의 선구적인 노력에 의해 생체분자의 결정화 (Crystallization) 과정 없이 원래의 상태를 유지한 채로 3차원 구조를 규명하는 CryoEM 기술이 탄생하였고, 지금까지 발전해왔다.



### 이미지프로세싱을 통한 고해상도 단백질 구조 규명

<그림 1> 초저온 투과전자현미경 기술 (CryoEM)을 활용한 생체분자의 고해상도 구조 규명 과정



<그림 2> CryoEM 해상도의 진보, Glutamate dehydrogenase의 저해상도 구조 (왼쪽), 고해상도 구조 (오른쪽) (단백질크기 334kDa, 출처: 노벨위원회, [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org))

### 또 한번의 CryoEM 기술 도약 : 고해상도 분자구조

국내에는 비교적 생소한 분야이지만, 앞에서 언급한 바와 같이 CryoEM 기술은 상당히 오랜 역사를 가진 기술이다. 그렇다면 왜 최근 들어서야 이 기술이 주목받게 되었을까? 기존의 X-선 결정학이나 핵자기공명분광학과 비교하여 소량의 단백질이 필요하고, 바이러스, 프로테아좀, 리보솜과 같은 200~300kDa 이상의 크기가 매우 큰 생체분자들의 구조를 규명할 수 있다는 장점에도 불구하고 고해상도 구조를 얻기 힘들다는 한계에 부딪혀 약 20여년 동안 구조생화학 분야의 중심에 서지는 못하였다. 하지만 2000년대 후반부터 이루어진 물리학 기반의 투과전자현미경 전자총과 수차보정 전자렌즈의 혁신적인 향상, 전자 기반의 Charge Coupled Device (CCD) 카메라의 단점을 획기적으로 극복한 direct electron detector device (DDD) 개발, 전산기반의 생체분자 이미지 빅데이터를 효율적으로 수집하고 계산할 수 있는 이미지프로세

싱 알고리즘과 소프트웨어 개발 등 다양한 분야의 융합적인 발전과 의생명과학 분야의 발전에 힘입어, 현재는 생체분자들의 분자수준 고해상도 구조 규명 (최고 ~2 Å, 아미노산의 Side Chain이 선명하게 구분될 정도)이 가능하기까지 이르렀다. 국제적 저명 학술지 Nature Method 지에서 발표한 2015년 대표기술로 선정될 정도로 구조생화학 분야의 블루오션으로 최근 크게 주목 받고 있으며, 전 세계적으로 매우 활발히 활용하기 시작하였다. 구조생화학 분야에서 가장 어렵게 여겨졌던 세포막 단백질들 (채널 단백질, GPCR 등), 단백질 수십 개가 모인 1MDa 이상의 큰 단백질복합체 (Spliceosome, 미토콘드리아 Respirasome, 26S Proteasome, 30nm Nucleosome 복합체 등), 병원성 바이러스/박테리아 (지카바이러스, 에이즈바이러스 등), X-선 결정학과 핵자기 공명분광학의 고유 영역으로 여겨졌던 100kDa 이하 크기의 작은 단백질, 천연물 혹은 화학의약품과 같은 작은 분자와 결합한 신약타겟 단백질 등의 구조 규명이 초저온 투과전자현미경 기술 (CryoEM)을 통해 가능해짐에 따라 향후 활용성에 대해 더 큰 기대를 갖게 한다. 향후 5~10년 내 생화학 교과서의 상당수의 생체분자의 3차 구조 그림들은 CryoEM 구조 연구 결과로 대체될 수 있을 것으로 생각되며, X-선 결정학의 역사를 미루어볼 때, CryoEM 기술을 활용한 생체분자 구조규명 연구 역시 향후 제2, 제3의 노벨상 수상자를 배출할 수 있을 것으로 예상한다. 구조생화학계의 새로운 패러다임을 창출하는 CryoEM 기술이 국내에서도 더욱 더 활성화 되기를 기대해 본다.

글 김호민 한국과학기술원 의과학대학원 부교수 hm\_kim@kaist.ac.kr

한국과학기술원 생명과학과에서 학사, 석사, 박사학위를 받았다. 미국 University of California, San Francisco에서 CryoEM을 전공으로 박사후 연구원을 지냈다. 현재 한국과학기술원 의과학대학원에서 X 선 결정학과 CryoEM 기술을 활용하여 질병관련 단백질 구조 규명 연구에 매진하고 있으며 단백질 구조 기반 단백질 엔지니어링 연구도 수행하고 있다.