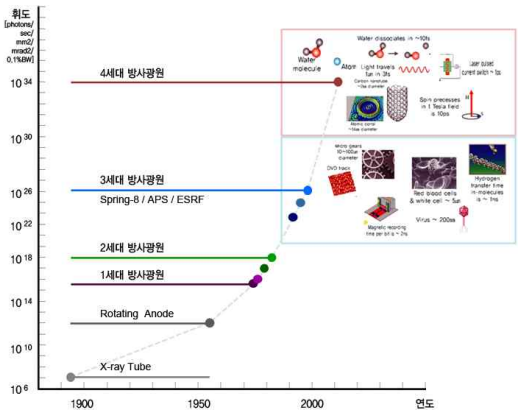
4세대 XFEL 가속기를 이용한 단백질 구조연구 동향

한국과학기술원 이지오 교수

1. 개요

최근 10 년간 구조생물학 분야에서 두 가지 새로운 연구 도구가 개발되면서 혁명적인 변화가 이루어지고 있다. 전자현미경을 이용한 단일입자분석 (single particle analysis) 방법을 이용하면 결정화가 되지 않는 단백질의 구조를 규명할 수 있으며, 4세대 가속기를 이용하면 나노미터 크기의 작은 결정을 이용하여서도 단백질 구조를 규명할 수 있다 (그림 1). X-ray 결정학을 이용한 구조생물학은 1960년대 헤모글로빈/미오글로빈 구조, DNA 이중 나선구조 연구에서 시작되었다. 이러한 연구는 완전히 새로운 생물학을 만들어 내었으며, 분자생물학이라는 현대 생물학이 비로소 시작될 수 있었다. 이후 60년간 x-ray 구조생물학은 비약적인 발전을 거듭하였으며, 현재 PDB 데이터베이스에는 13 만개의 구조가 등록되어있고, 대략 20번 이상의 노벨상이 이 분야에만 수여되었다. 하지만 x-ray 구조생물학의 기본 원리와 연구방법에 근본적인 변화라고 할 수 있는 것은 1960년 이후로 거의 없었으며, 인간 단백질의 90%는 여전히 고해상도 입체구조가 알려져 있지 않다. 이러한 문제는 특히 세포막 단백질이나 대형 단백질 구조체 분야에서는 더욱 심각한 문제로 남아있다. 또한, 현재까지 거의 모든 구조생물학연구는 정지되어있는 단백질 구조규명에 집중되어 있었다. 하지만, 단백질은 능동적인 구조변화를 항상 하고 있으며, 이러한 구조변화는 단백질의 활성이나, 조절에 핵심적인 역할을 하고 있다. 따라서, 정지되어 있는 단백질 구조만으로는 단백질의 생물학적인 특성을 이해하는 데에 한계가 있을 수밖에 없다. 최근 우리나라를 비롯한 각국에서 제 4세대 방사광 가속기가 완공되면서 이러한 한계를 극복할 수 있는 새로운 연구방법들이 활발하게 개발되고 있다.



<그림 1> 4세대 가속기 photon flux 비교. PAL-XFEL 연구소 (http://pal.postech.ac.kr)

4세대 방사광 가속기는 엑스선 자유전자 레이저 (x-ray free electron laser: XFEL)이라고 불리는 새로운 엑스선 발생장치이다. 기존의 3세대 방사광 가속기에 비하여 거의 완전한 공간 결맞음, 펨토초 수준의 초 단파 및 수억배 이상의 고휘도 엑스선을 만들어 낼 수 있다 (그림 1). 이러한 특성을 이용하면 나노미터 크기의 작은 단백질 결정을 이용하여서도 구조규명이 가능해지며, 마이크로초에서 밀리초 수준의 빠른 단백질 구조변화를 실시간으로 관측하는 것이 가능해진다. 우리나라에서는 포항가속기 연구소에 LCLS (미국), SACLA (일본), European XFEL (EU)와 함께 세계에서 3 번째로 단백질 구조를 연구할 수 있는 4세대 가속기가 올해부터 운영이 되기 시작하였다.

2. 4세대 가속기의 필요성

현대 구조생물학의 한계는 4세대 XFEL 가속기에 의하여 최소한 부분적으로는 해결될 수 있을 것으로 기대되고 있다. XFEL은 크게 다음 두 가지 부분에서 구조생물학에 큰 변화를 불러올 것으로 예상된다. 첫째로, 획기적으로 작은 나노크리스탈을 이용하여서도 구조규명이 가능해 질것으로 예상된다. 기존의 3세대 가속기를 이용한 구조연구를 위해서는 대략 10~50 마이크론 크기의 단백질 크리스탈이 필요하다. 하지만, 많은 단백질의 경우 이 정도 크기의 크리스탈을 만드는 것이 거의 불가능하다. 특히 현대 구조생물학에서 가장 중요한 표적인 세포막 단백질이나 대형 단백질 복합체의 경우에는 이러한 문제가 더욱 심각한 상황이다. 하지만 4세대 가속기에서는 기존의 3세대 가속기에서 얻을 수 있는 x-ray에 비하여 수억 배 더 강한 빔을 얻을 수 있기 때문에 크기가 1 마이크론 이하의 나노 크리스탈을 이용하여서도 구조규명이 가능하다. 따라서, 기존의 가속기를 이용하여서는 불가능하였던 단백질 구조연구가 XFEL에

의하여 가능해 질것이며 향후 관련 기술이 발전하면 더욱 작은 크기의 나노 크리스탈을 이용하여서도 단백질 구조 규명이 가능해 질것으로 예상된다. 이러한 발전은 특히 세포막 단백질이나 대형단백질 구조연구에서 더욱 큰 파급효과가 있을 것이다. 둘째로, XFEL은 단백질 시분해 동력학 발전에 큰 역할을 할 것으로 예상된다. 단백질 크리스탈을 이용한 단백질 동력학 연구는 그 동안 연구가 지속적으로 이루어져 왔지만, 뚜렷한 기술적인 한계가 있었다. 생물학적으로 중요한 단백질 구조변화는 마이크로에서 밀리 초 단위에서 이루어진다. 이렇게 빠른 구조 변화를 연구하기 위해서는 크리스탈의 회절능력이 정지상 구조연구에 비하여 월등히 강하여야 하며, 회절 패턴도 더욱 선명하게 얻을 수 있어야 한다. 이러한 한계 때문에 크리스탈 상태의 단백질 동력학 연구는 몇 몇 단백질에만 한정되어 있으며, 생물학적으로 중요한 단백질 연구에 광범위한 파급효과를 가지기는 어려운 상태였다. 4세대 XFEL 가속기는 이러한 한계를 상당부분 해결하여 줄 수 있다. 3세대 가속기에 비하여 훨씬 작은 크기와 열악한 회절 패턴을 가지는 대부분의 크리스탈을 이용하여서도 동적인 단백질 구조변화를 연구할 수 있을 것이며, 지금보다는 훨씬 다양한 단백질을 이용한 동력학 연구가 가능해질 것이다.

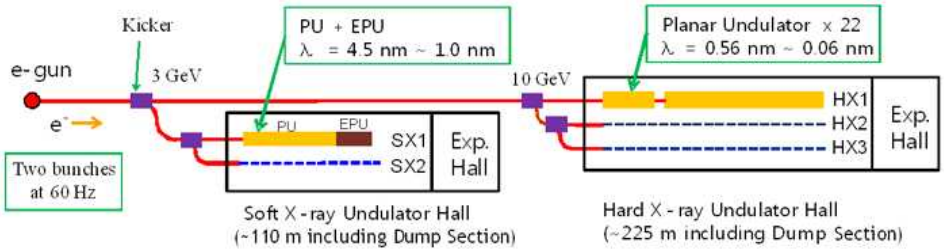
구체적인 예로 XFEL이 해결할 수 있는 생물학 중요 문제 중 일부를 다음과 같이 나열해 볼 수 있다.

- 세포막 단백질 구조연구. 세포막 단백질은 전체 인간 유전자의 30%를 차지하며, 전체 의약품 표적의 50% 이상을 차지하는 핵심 연구 분야이다. 하지만, 현재 밝혀진 세포막 단백질 구조는 전체 단백질 구조의 1% (~700개) 정도에 불과하다. XFEL은 세포막 단백질 구조생물학에 큰 변화를 가져올 것이다. 대표적인 세포막 단백질 구조연구 성공사례는 McKinnon 그룹의 이온채널 연구 (2003년 노벨 화학상), Kobilka 그룹의 GPCR 연구 (2012년 노벨 화학상)가 있다.
- 생명현상의 기본이 되는 대형 단백질 복합체 구조연구. 세포의 기본 기능은 DNA 복제, 전사, 단백질 합성, 단백질수식, 유비퀴틴화 등이다. 이러한 과정은 정교한 조절이 필요하기 때문에 주로 백만달톤 이상의 크기를 가지는 대형 단백질 복합체가 수행하고 있다. 구조의 복잡성과 생산 및 결정화의 어려움 때문에 최근까지도 이러한 대형 단백질 구조연구는 빠른 발전을 가져오지 못하고 있다. XFEL 연구는 이러한 단백질 복합체들의 구조, 활성, 조절 연구에서 큰 변화를 가져올 것으로 기대된다.
- 단백질 시분해 동력학 연구. 단백질은 끊임없이 구조가 변화되면서 생물학적인 활성이 조절 되고 있다. 지금까지의 대부분 단백질 구조연구는 정지된 상태의 구조에 집중되어 있었다. XFEL의 강한 x-ray 빔을 이용하면 단백질 시분해 구조변화

연구가 지금보다 훨씬 다양한 단백질 패밀리에 적용 가능해 질 것이며 단백질 구조변화의 핵심 원리를 이해할 수 있게 될 것으로 기대된다.

2-1 포항 4세대 가속기 (PAL-XFEL) 빔라인 특성

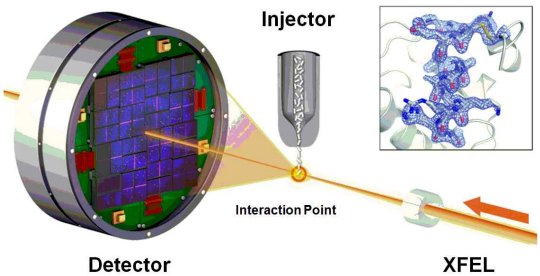
Hard x-ray 파장: 0.56~0.06 nm (그림 2)
Soft x-ray 파장: 4.5~1.0 nm
photon flux (at 0.1 nm): 1 x 10^{12} photon/pulse
Beam energy: 10Gev
Repetition rate: 60 Hz



<그림 2> PAL-XFEL 빔라인 배치도. PAL-XFEL 연구소 (http://pal.postech.ac.kr)

2-2 XFEL을 이용한 단백질 결정학 실험셋업 및 데이터 분석

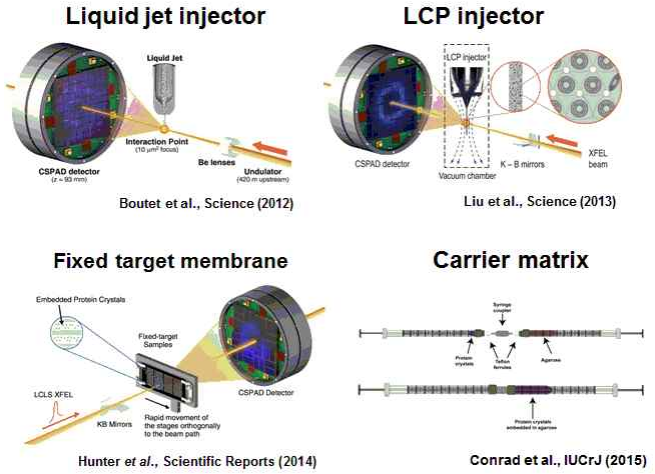
XFEL을 이용한 단백질 결정학 연구는 높은 광도의 XFEL을 이용하여 단백질 결정 시료에 대한 구조적 정보를 얻는다. 짧은 X선 펄스를 이용하여 "Diffraction before destruction" 기법을 이용하여 데이터를 얻게 되는데, 집속된 강력한 X선의 특성으로 결정시료는 X선과 반응 후 파괴된다. 때문에 3차원 구조정보를 획득하기 위하여 일반적으로 시료 배송 방법의 하나인 인젝터 (또는 고정막)를 이용하여 다수의 결정 시료를 연속적으로 X선 위치로 이동시키며, 회절데이터를 수집하게 된다 (그림 3).



<그림 3> XFEL 단백질 결정학 실험의 일반적인 셋업. 집속된 XFEL은 인젝터에서 연속적으로 배송되고 결정시료와 반응하여 회절 신호를 제공하게 되며,

검출기를 통해서 구조 정보를 기록하게 된다.

시분해 시리얼 펨토초 결정학 실험셋업은 일반적인 실험셋업에 광학 레이저와 같이 시료의 펌프 역할을 해주는 매개체가 시료를 먼저 활성화 시키고 표적으로 하는 시간 타이밍에 맞춰 X선과 반응하여 회절데이터를 수집하게 된다. XFEL을 이용한 시리얼 펨토초 결정학 연구의 실험 셋업은 비교적 간단하지만, 시료에 가장 적합한 배송장치 (시료의 환경, 시료의 양등)에 따라 셋업이 필요하다. 시료 배송장치는 액체빔 인젝터 (Liquid jet sample injector), LCP (Lipidic cubic phase) 인젝터, Carrier matrix를 이용한 인젝터 및 시료를 그리드 막에 고정하여 측정하는 방법이 일반적이다 (그림 4). 액체빔 인젝터는 일반적인 수용성이 높은 결정 시료들에 적합하다는 장점이 있지만, 액체빔의 안정성을 높이기 위하여 높은 유속을 사용하기 때문에 많은 시료의 양이 필요하다는 단점이 있다. LCP 인젝터는 일반적으로 LCP 환경에서 결정화된 막 단백질을 위해 개발되었으며, 낮은 유속에도 안정하게 X선 위치로 배송하기 때문에 적은 량의 결정 시료를 포함한다는 장점이 있다. LCP의 낮은 유속의 장점을 활용한 것이 carrier matrix를 활용한 수용성 단백질 결정 시료 (또는 막단백질도 가능)를 이용할 경우 시료양을 줄일 수 있다는 장점이 있다. 끝으로 그리드 막에 결정시료를 고정시켜 놓고 데이터를 수집하는 방법이 있다. 고정된 시료이기 때문에 높은 hit rate와 함께 시료 양을 절감할 수 있다는 장점이 있지만, 높은 repetition의 XFEL를 사용할시 사용에 제약이 있을 수 있다. 현재 4가지 일반적인 시료배송장치 중 향후 연구에 적합한 시료 환경에 대한 테스트가 필요하게 된다.



<그림 4> XFEL 결정학 연구 관련 시료 배송 방법.

시리얼 펨토초 결정학은 XFEL 연구분야 중에 가장 많은 데이터 확보를 요구한다. 3세대의 경우 단일 결정 시료를 goniometer에서 회전시키며 3차원 구조 정보를 획득하는 반면 4세대의 경우는 앞서 언급된 강력한 XFEL의 특성으로 다수의 결정시료로부터 고해상도 3차원 구조 정보를 획득하게 되며, 기존 3세대에 비해서 수백-수천 배 이상의 이미지로부터 구조 정보를 추출하게 된다. 인젝터에서 분사되는 결정들은 random orientation을 갖지만, 동일한 결정symmetry를 갖고 있다. 다수의 이미지로부터 회절 패턴의 Bragg peak들을 index하고 시료와 시료 사이의 결정 축을 보정하면 3차원에 해당하는 구조 정보를 얻을 수 있다. 이 과정에서 사용되는 프로그램은 크게 2가지로 나눌 수 있다. 첫째, 데이터를 pre-processing해주는 프로그램 (Cheetah, CASS, Onda 등)으로 실시간으로 회절 현상을 모니터할 뿐만 아니라 인젝터로부터 배송되는 시료의 hit rate, resolution에 대한 정보를 제공한다. 뿐만 아니라 시료배송과정에서 함께 분사되는 용액 등과 검출기로부터 나오는 노이즈에 대한 subtraction을 수행하게 된다. 실제 구조적인 정보를 얻기 위해서는 각 이미지에 대한 indexing을 통하여 프로세싱 가능한 이미지를 추출하고 이후에 얻게 된 이미지들에 대한 integration과정 그리고 merge된 회절 정보를 통하여 최종적으로 구조 정보를 포함한 파일을 얻게 되는 프로그램 (CrystFEL, cctbx.xfel) 을 이용하게 된다. 상기 분석 프로그램들은 이용하여 처리하게 되는 데이터의 양 (수십만-수백만장)은 GPU-기반의 컴퓨터를 이용하여 처리 효율을 높일 수 있다.

3. 해외 4세대 방사광 가속기 활용사례

최초의 XFEL 가속기인 미국 LCLS는 지난 2009년부터 이미 7 년간 가동이 되어왔으며, 일본 SACLA 가속기도 최근 본격적으로 연구결과를 만들어내고 있다. 우리는 이들 나라에 비하여 비록 시간적으로 뒤쳐져 있지만 전략적으로 중요한 분야를 선점할 수 있다면 기초과학과 제약 산업의 획기적인 발전에 기여할 수 있을 것이다.

<u>LCLS:</u>

A. CXI beamline
   시리얼 펨토초 결정학
   시분해 시리얼 펨토초 결정학
B. MFX beamline
   시리얼 펨토초 결정학
   X선 결정학

<u>SACLA</u>

A. BL3 beamline (EH2, EH4c)
   시리얼 펨토초 결정학
B. BL2 beamline (EH3/EH4b)
   시리얼 펨토초 결정학

<u>European XFEL</u>

Repetition rate: 27,000 Hz
Wavelength: 4.7 ~ 0.05 nm
Brilliance: 1.6 x 10^{25} photons/s/mm^2/$mrad^2$

3-1. XFEL을 이용한 단백질 구조연구 주요성과

세포막 단백질 구조분석

1. M. Suga et al. Nature 2015, 517, 99-103 (SACLA, beamline 3)
2. Y. Kang et al. Nature 2015, 523, 561-567 (LCLS, CXI)
3. H. Zhang et al. Cell 2015, 161, 833-844 (LCLS, CXI)
4. C. Kupitz et al. Nature 2015, 513, 261-265 (LCLS, CXI)

5. W. Liu et al. Science 2013, 342, 1521-1524 (LCLS, CXI)
6. J. Kern et al. Science 2013, 340, 491-495 (LCLS, CXI)

질환관련 단백질 구조분석

1. J.A. Rodriquez et al Nature, 2015, 525, 486-490 (LCLS, CXI)
2. L. Redecke et al Science, 2013, 339, 227-230 (LCLS, CXI)

시분해 단백질 구조분석

1. T.R. Barends et al. Science 2015, 445-450 (LCLS, CXI)
2. J. Tenboer et al. Science 2014, 346, 1242-1246 (LCLS, CXI)
3. C. Kupitz et al. Nature 2015, 513, 261-265 (LCLS, CXI)
4. J. Kern et al. Science 2013, 340, 491-495 (LCLS, CXI)

Serial Femtosecond 결정학 테크닉 개발

1. K. Ayyer et al. Nature 2016, 530, 202-206 (LCLS, CXI)
2. T.R. Barends et al. Nature 2014, 505, 244-247 (LCLS, CXI)
3. S. Boutet et al. Science 2012, 337, 362-364 (LCLS, CXI)

4. 고찰

포항가속기 연구소의 4세대 가속기는 작년 말에 완공되었다. 본격적인 운영이 금년 하반기부터 시작되면서 우리나라도 단백질 나노 크리스탈로그래피와 시분해 구조전이 연구를 시작할 수 있게 되었다. 건설된 가속기는 성능면에서 미국이나 일본의 가속기에 비하여 아직 부족한 점이 있는 상태이지만, 성능을 높여가면, 선진국과 경쟁할 수 있는 장치가 될 수 있을 것으로 기대된다. 관련 연구가 세계적인 경쟁력을 가지게 되려면 앞으로도 몇 가지 면에서 추가적인 발전과 지속적인 업그레이드가 필요하다. 첫 번째로 x-ray 빔의 밝기가 좀 더 향상되어야 한다. 현재 포항 XFEL의 밝기는 LCLS의 1/10 정도로 추정된다. 장치의 최적화를 좀 더 진행하여 빛의 밝기를 높여야 작은 크기의 나노크리스탈을 이용한 구조연구가 원활해질 것으로 기대된다. 둘째로, 시분해 구조변화 연구를 위해서는 반응을 개시하는 방법에서 지속적인 연구와 발전이 필요하다. 현재는 광학 레이저를 이용하여 펌프-프로브 방식으로 반응을 개시하는 방법을 이용하고 있는 데, 다양한 파장의 레이저 장치

를 구비하여 용이한 실험이 가능하도록 하여야 한다. 마지막으로 연구자들과의 소통 강화를 통하여 관련 분야 연구자 그룹을 양성하고 같이 성장하여야 할 것으로 보인다.

5. 참고문헌

1. Boutet, S. et al. High-resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography. Science 337, 362-4 (2012).
2. Conrad, C.E. et al. A novel inert crystal delivery medium for serial femtosecond crystallography. IUCrJ 2, 421-30 (2015).
3. Hunter, M.S. et al. Fixed-target protein serial microcrystallography with an x-ray free electron laser. Sci Rep 4, 6026 (2014).
4. Liu, W. et al. Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors. Science 342, 1521-4 (2013).