

총 설

금속 함유 효소(Metalloenzymes)의 연구에서 전자-핵 이중 공명(Electron-Nuclear Double Resonance)과 전자 스핀 메아리 변조(Electron Spin Echo Envelope Modulation)의 응용

경북대학교 화학교육과
이홍인

I. 서론

생명 현상을 유지하기 위하여 많은 경우에 전이금속(transition metal)들이 매우 결정적인 역할을 하고 있음이 관찰된다.^{1,2} 이러한 전이금속들은 생체내의 대사 과정 중에 여러 가지의 산화 상태(oxidation state)를 보이고 산화 상태에 따라 외톨이 전자(unpaired electron)를 가지고 있게 된다. 이 외톨이 전자는 전자 스핀(electron spin)에 의하여 자기적 성질, 즉, 자기 모멘트(magnetic moment)를 가진다. 따라서, 외톨이 전자를 가지고 있는 분자를 자장(magnetic field) 속에 놓아두면 자기 모멘트와 자장 사이에 상호 인력이 작용하게 되는데 이를 electron Zeeman interaction이라고 한다.^{3,4} 또한 외톨이 전자 근처에 자기 모멘트를 가지고 있는 핵이 존재하면 전자의 자기 모멘트와 핵의 자기 모멘트 사이에도 역시 상호 인력이 작용하게 되고 이를 초미세 상호작용(hyperfine interaction)이라고 부른다.^{3,4} 전자 상자성 공명(electron paramagnetic resonance, EPR)은 이러한 electron Zeeman interaction과 초미세 상호작용을 측정하는 분광법으로서 EPR로부터 우리는 외톨이 전자 근처의 구조나 조성 등의 특성을 알아볼 수 있다. 이를 응용하여 EPR의 여러 분광 기술들은 그동안 금속 함유 효소(metalloenzyme)의 활성 자리(active site)의 구조와 작용 등을 연구하는데 있어서 주요한 역할을 담당하여왔다.⁵⁻⁸

EPR 실험으로부터 얻게 되는 정보의 대부분은 초미세 상호작용과 $I \geq 1$ 인 핵이 전자 스핀 근처에 있을 경우에 핵 사중극자 상호작용(nuclear quadrupole interaction)의 크기로부터 얻게 된다. 금속 함유 효소의 경우에는 간단한 분석에 의하여 활성 자리의 화학적 조성, 즉 금속(예를 들어, ⁵¹V, ⁵⁵Mn, ⁵⁷Fe, ⁵⁹Co, ⁶¹Ni,

^{63,65}Cu, ^{95,97}Mo 등)과 그 리간드(예를 들어, ^{1,2}H, ¹³C, ^{14,15}N, ¹⁷O, ¹⁹F, ³¹P, ³³S 등)의 조성을 알 수 있다. 이들 상호작용의 크기를 좀 더 자세히 분석하면 금속과 주변 환경의 기하학적 구조, 기질(substrate)이나 억제제(inhibitor)의 금속에 대한 결합 등의 구체적 정보를 얻어낼 수 있게 된다.

금속 함유 효소와 같은 고분자의 경우에 만일 결정을 기르고 이 시료에 대하여 EPR 실험을 한다면 원칙적으로는 위의 상호작용들의 크기 및 정보를 모두 얻을 수 있다. 그러나 이의 어려움 때문에 많은 경우에 분자를 용액에 녹이고(이는 특히 생물 분자의 경우 생물체내에서의 반응을 흉내낼 수 있는 좋은 방법이다.) 이 용액을 저온에서 얼린 상태에서 EPR 실험을 하게 된다. 이럴 경우에는 비균일 선폭 증가(inhomogeneous line broadening) 때문에 넓게 퍼진 형태의 EPR 스펙트럼이 얻어지게 된다. 이 때 스펙트럼으로부터 electron Zeeman interaction의 크기는 쉽게 알 수 있으나 초미세 상호작용과 핵 사중극자 상호작용은 그 크기가 클 경우에만 부분적으로 스펙트럼 상에 분리되어 나타날 뿐이고 대부분의 경우에는 분리되지 않는다. EPR에서 분리되지 않는 초미세 상호작용과 핵 사중극자 상호작용을 측정 가능하게 하는 분광법이 바로 전자-핵 이중 공명(electron nuclear double resonance, ENDOR)과 전자 스핀 메아리 변조(electron spin echo envelope modulation, ESEEM) 분광법이다.⁵⁻⁸

ENDOR는 외톨이 전자의 전자 스핀과 근처에 있는 핵의 핵 스핀이 상호작용하고 있을 때 핵 스핀 전이(nuclear magnetic resonance, NMR)를 EPR로 측정하는 방법이다. 따라서 이 실험에서는 핵 스핀 전이와 전자 스핀 전이가 동시에 일어나게 되므로 전자-핵 이중 공명(electron nuclear double resonance)이라고 한다. NMR

에서와 마찬가지로 핵 스핀의 전이를 위해 radiofrequency (RF)를 시료에 주사하면서 EPR의 세기를 측정하면 핵 스핀 전이가 일어날 때 EPR의 세기가 변화하는 것을 관찰할 수 있다. ENDOR에서는 RF의 주파수에 따라 선택적으로 핵 스핀 전이를 일으킬 수 있기 때문에 EPR에서 보이지 않는 약한 초미세 상호작용과 핵 사중극자 상호작용의 크기를 관측할 수 있다.^{5,6,8}

ESEEM에서는 핵 스핀 전이를 위해 RF를 사용하지 않고 대신에 EPR 실험에서 사용하는 microwave를 펄스의 형태로 시료에 주사하여 전자 스핀 메아리 (electron spin echo)를 유도하고 이 메아리의 세기의 변화를 시간 축에서 관찰한다. 얻은 데이터를 푸리에 변환 (Fourier transform)하면 ENDOR 스펙트럼과 비슷한 스펙트럼을 얻을 수 있고 ENDOR와 마찬가지로 약한 초미세 및 핵 사중극자 상호작용의 크기를 관측할 수 있다.^{5,7,8} ENDOR와 ESEEM은 민감하게 관측할 수 있는 초미세 상호작용과 핵 사중극자 상호작용의 크기가 다르기 때문에 두 방법은 서로 보완적으로 사용되고 있다.

이 글에서는 EPR, ENDOR 및 ESEEM의 원리에 대하여 설명하고 ENDOR와 ESEEM을 응용한 금속 함유 효소의 연구의 몇 가지 흥미로운 결과들의 예를 들겠다.

II. 전자 상자성 공명 (EPR, Electron Paramagnetic Resonance)

위에서 언급한 바와 같이 EPR은 외톨이 전자의 전자 스핀에 의한 자기 모멘트와 자장과의 상호작용을 측정하는 분광법이다.^{1,2} 전자 스핀 ($S = 1/2$)을 외부 자장 속에 놓아두면 전자 스핀의 up ($|\alpha\rangle$ 또는 $m_s = +1/2$) 상태와 down ($|\beta\rangle$ 또는 $m_s = -1/2$) 상태는 각각 자장과 상호작용 (electron Zeeman interaction) 하게 되는데 이 때 그 크기가 다르므로 그림 1의 실선으로 나타나는 바

와 같이 에너지 준위가 갈라지게 된다. 이 때 자장의 세기에 따른 두 상태의 에너지 차이는

$$\Delta E = g\beta B_0 \quad [1]$$

로 주어지고 g 는 전자의 g -factor, β 는 Bohr magneton, B_0 는 자장의 세기이다. ΔE 는 대략 microwave가 가지고 있는 에너지 정도이다. 현재 EPR 실험에서 가장 많이 사용되고 있는 microwave의 주파수 영역은 대략 9 GHz이고 이를 흔히 X-band 라고 한다. 그밖에 표 1에서 보는 바와 같이 여러 영역의 주파수들이 사용되고 있다. 각각은 g -factor 혹은 초미세 상호작용의 상대적인 크기와 관찰하고자 하는 목적에 따라 활용도를 달리한다. (g 값을 정확히 얻기위하여는 고 주파수 영역으로, 초미세 상호작용의 크기를 정확히 얻기위하여는 저 주파수 영역으로.)

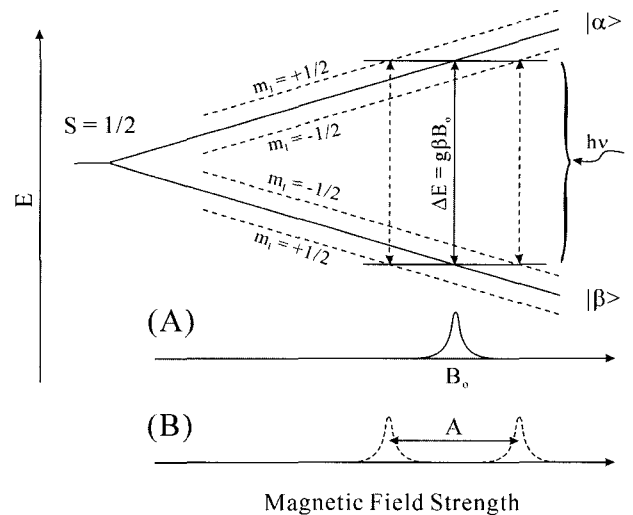


그림 1. $S = 1/2$ 인 전자와 $I = 1/2$ 인 핵을 가지고 있는 계가 외부 자장 속에 놓여있을 때의 전자 스핀의 에너지 준위도와 EPR 스펙트럼. 실선과 (A)는 전자 ($S = 1/2$) 만이 있을 경우의 에너지 준위도와 EPR 스펙트럼이고 점선과 (B)는 핵 ($I = 1/2$)을 포함할 경우의 에너지 준위도와 스펙트럼이다. 화살표는 각 경우에서 전자 스핀 전이를 나타낸다.

전자 스핀 전이 (resonance)는 시료에 주사한 microwave의 에너지 ($h\nu$) 와 ΔE 가 같을 때 일어나고 이 때 EPR 흡수선을 관찰할 수 있다. 일반적으로 EPR 실험은 microwave의 주파수를 고정하고 자장의 세기를 변화 시키면서 흡수선을 관찰하므로 $Bo = h\nu / g\beta$ 를 만족하는 자장의 세기에서 EPR 신호를 볼 수 있다. (그림 1(A)) Bo 와 ν 는 실험에서 얻어낼 수 있는 수치이고 β 는 상수이므로 결국 EPR은 $g (= h\nu / \beta Bo = 714.4775 \times \nu \text{ (GHz)}/Bo\text{(G)})$ 값을 구하고자 하는 실험이다. g 값의 의미에 대하여는 뒤에서 설명하겠다.

전자 스핀 근처에 만일 $I = 1/2$ 인 핵이 존재 한다면 전자 스핀과 핵 스핀 사이의 초미세 상호작용 때문에 전자 스핀의 에너지 준위가 그림 1의 점선으로 표시되어 있는 것처럼 좀더 갈라지게 된다. 전자 스핀 전이의 선택 규칙 (selection rule)은 $\Delta m_s = \pm 1$ 과 $\Delta m_l = 0$ 이므로 자기장의 세기를 변화 시키면서 EPR 신호를 관측하면 Bo 을 중심으로 그림 1(B)처럼 A 만큼 서로 떨어진 두 개의 EPR 흡수 신호를 볼 수 있다. A 가 바로 초미세 상호작용의 크기이다.

Band	주파수 (GHz)
L	1
S	3
X	9
P	15
K	18
Q	35
W	94

표1. EPR 실험에서 사용되는 주파수 영역

따라서 EPR로부터 g 와 A 값, 즉 electron Zeeman interaction과 초미세 상호작용의 크기를 알 수 있다.

그러나 우리가 관심을 가지고 있는 금속 함유 효소에 있는 전이 금속들에 있어서 electron Zeeman interaction의 크기는 외부 자장과 분자의 상대적인 방향에 따라 그 크기가 다르고 이 크기의 다름은 g -텐서에 의하여 표시된다. 따라서 공간적으로 무질서하게

분포되어 있는 고체 시료로부터 EPR 스펙트럼을 얻으면 그림 2(A)에서와 같이 비균일 선폭 증가에 의하여 넓게 퍼진 형태의 스펙트럼이 보인다. 이를 그림 2(B)에 보이는 바와 같이 자장에 대하여 1차 미분하면 g -텐서의 세 주요 값 (g_1, g_2, g_3)을 얻을 수 있다. (실제로 대부분의 EPR 실험에서는 EPR 신호를 증가시키기 위하여 그림 2(B)와 같이 미분 형태의 스펙트럼을 얻는다.) 전이 금속에 있어서 g -텐서의 값들은 금속의 d-오비탈들 사이의 에너지 차이에 의하여 영향을 받는다. 따라서 g -텐서의 값들로부터 금속의 산화수, 리간드의 종류 및 배위 구조 등의 금속 및 그 주변 환경에 대하여 대략적으로 알 수 있다.

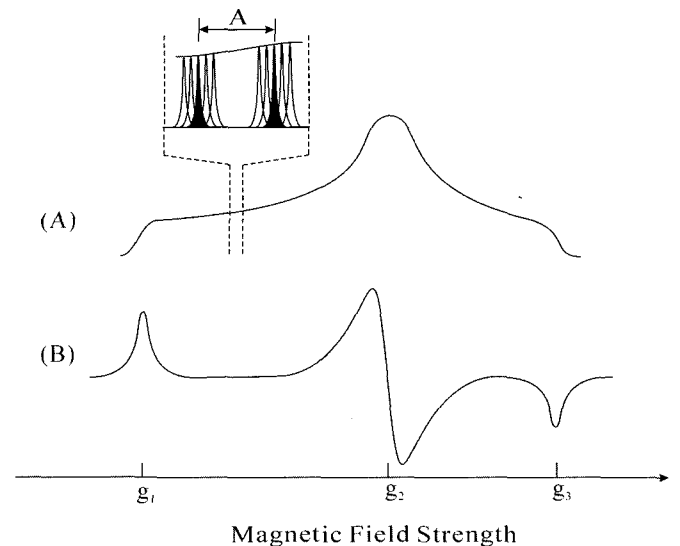


그림 2. 공간적으로 무질서하게 분포되어 있는 고체 시료로부터 얻은 비균일 선폭 증가된 EPR 스펙트럼의 모양. 그림은 rhombic EPR 스펙트럼 ($g_1 \neq g_2 \neq g_3$)의 모양이다. (A) 흡수 형태 (B) 자장에 대하여 1차 미분한 형태. (A)에서 확대된 모형은 개개의 상자성 센터의 전자 스핀 packet 이 전자-핵 사이의 초미세 상호작용에 의해 갈라짐을 나타낸다. 그러나 이 갈라짐은 비균일 선폭 증가된 EPR 흡수선 아래에서 분리되지 않는다.^{6,9}

III. 전자-핵 이중 공명

(ENDOR, Electron-Nuclear Double Resonance)

외톨이 전자 근처에 자기적 성질을 가지고 있는 핵이 존재하면 전자 스핀과 핵 스핀 사이의 초미세 상호작용 때문에 그림 1(B)에 나타나는 바와 같이 EPR의 흡수 신호가 두 개로 갈라지게 된다. (하나의 EPR 흡수선이 갈라지는 수 $2I+1$ 로 주어진다). 그런데 EPR 신호가 그림 2에서와 같이 비균일 선폭 증가된 형태로 나타났을 때는 초미세 상호작용에 의한 EPR 선의 갈라짐이 넓게 퍼진 EPR 흡수선에 과몰려서 (그림 2(A)) 초미세 상호작용의 크기를 측정할 수 없게 된다. 이러한 EPR로 분리되지 않는 초미세 상호작용을 측정하는 분광법이 ENDOR이다.^{5,6,8,9}

그림 3(A)는 $S = 1/2$ 인 전자와 $I = 1/2$ 인 핵을 가지고 있는 계가 일정한 세기의 자장 속에 놓일 때의 스핀 양자수에 따른 에너지 준위를 나타낸 것이다. ENDOR 전이는 그림에서 실선의 화살표로 표시되어 있다. (선택 규칙; $\Delta m_s = 0$ 과 $\Delta m_l = \pm 1$). ENDOR 신호를 관측하기 위하여서는 그림 3(A)에서 보이는 바와 같이 핵 스핀 전이 (ENDOR 또는 NMR 전이)를 일으켜야 하므로 radiofrequency (RF)를 시료에 주사하여야 한다. RF의 주파수를 변화시키면서 EPR 신호 (ν_{EPR1} 이나 ν_{EPR2})의 세기를 관측하면 RF가 ν_α 이거나 ν_β 일 때 그림 3(B)에서 처럼 EPR 신호의 세기가 변화하는 ENDOR 스펙트럼을 얻을 수 있다.

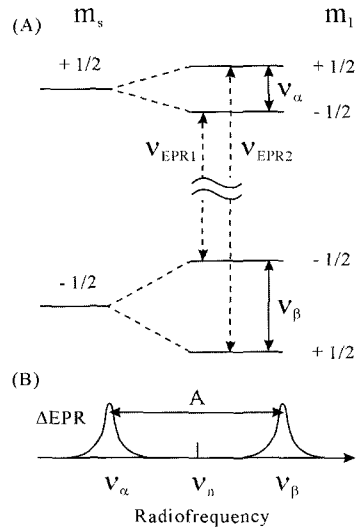


그림 3. (A) $S = 1/2$ 인 전자와 $I = 1/2$ 인 핵을 가지고 있는 계가 일정한 세기의 자장 속에 놓일 때의 스핀 양자수에 따른 에너지 준위. EPR 전이는 점선, ENDOR 전이는 실선의 화살표로 표시되어 있다. EPR 전이의 에너지 차이는 실제로 ENDOR 전이의 에너지 차이보다 약 1000 배 정도 크다. (B) ENDOR 스펙트럼의 예.

이때, 핵 스핀 전이의 에너지, 즉 주파수, ν_α 와 ν_β , 는 다음과 같이 주어진다.

$$\nu_{\alpha(\beta)} = |\nu_n \pm A/2| \quad [2]$$

여기서, ν_n 은 핵의 Larmor 주파수이고 A는 초미세 상호작용의 크기이다. 따라서, ENDOR 신호의 위치로부터 우리는 초미세 상호작용의 크기를 알 수 있다.

ENDOR 실험은 EPR 측정을 위한 microwave와 핵 스핀 전이를 위한 RF를 시료에 주사하는 방법에 따라 여러 가지 방법이 쓰이고 있는데 그림 4는 그 중에서 가장 많이 쓰이고 있는 CW-ENDOR와 Davies ENDOR¹¹ 및 Mims ENDOR¹² 를 그림으로 나타낸 것이다.

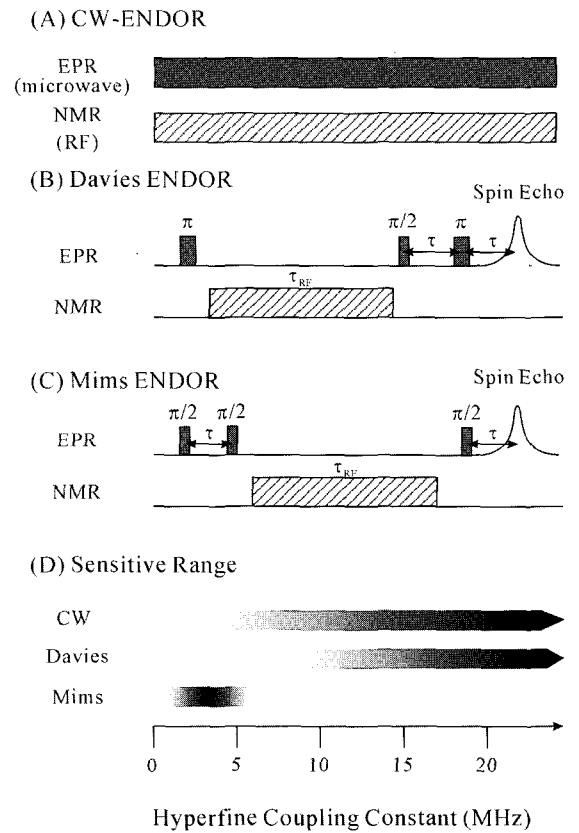
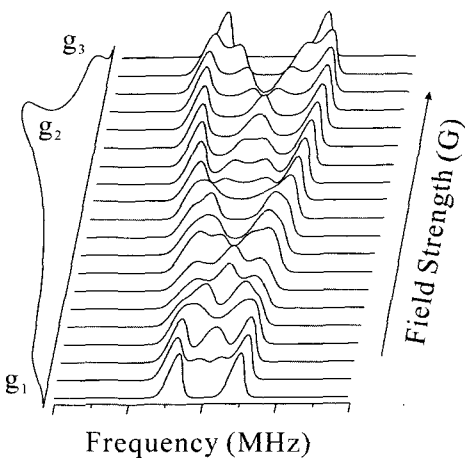


그림 4. ENDOR 실험의 종류와 민감하게 측정할 수 있는 초미세 상호작용의 크기. (A) CW-ENDOR (Continuous wave ENDOR).

(B) Davies ENDOR. (C) Mims ENDOR. (D) 민감하게 측정할 수 있는 초미세 상호작용의 크기의 영역. Davies 와 Mims ENDOR에서 microwave 펄스의 시간 두께는 대략 10-40 ns 이고 RF 펄스는 대략 5-60 μ s이다. 펄스 사이의 시간 간격 τ 는 100-300 ns 이다.^{8,10}

CW-ENDOR에서는 microwave와 RF를 연속하여 시료에 주사하면서 RF의 주파수에 따른 EPR 신호의 세기를 측정한다. Davies와 Mims ENDOR에서는 microwave를 펄스의 형태로 주사하여 전자 스핀 메아리를 유도하고 RF도 역시 펄스의 형태로 주사하면서 RF의 주파수에 따른 메아리의 세기를 측정한다. 그림 4(D)는 각각의 ENDOR가 민감하게 측정할 수 있는 초미세 상호작용의 크기의 영역 표시한 것이다.

EPR에서와 마찬가지로 공간적으로 무질서하게 분포되어 있는 고체 시료로부터 ENDOR 스펙트럼을 얻으면 그림 3(B)에서와 같은 단순한 스펙트럼이 얻어지는 것이 아니라 넓게 퍼진 형태의 스펙트럼을 얻게 된다. 이는 초미세 상호작용도 자장과의 상대적 방향에 따라 그 크기가 달라지게 때문이고 이는 초미세 상호작용 텐서로 정확히 표현할 수 있다. 이를 구하기 위하여 그림 5에서와 같이 EPR 흡수가 일어나는 여러 자장의 위치에서 ENDOR 스펙트럼을 얻어보면 어떠한 형태를 보이게 된다.



이를 분석함으로써 초미세 상호작용 텐서의 세 주요값 (A^1, A^2, A^3)과 초미세 상호작용 텐서와 g-텐서의 상대적인 방향에 대하여 알 수 있다. 또한

그림 5. EPR 흡수가 일어나는 자장의 여러 위치에서 얻은 ENDOR 스펙트럼.⁶

$I \geq 1$ 인 핵이 외톨이 전자 근처에 있을 때는 ENDOR로부터 핵 사중극자 상호작용의 크기도 관측할 수 있다.

금속 함유 효소의 경우에 초미세 상호작용은 금속에 위치한 외톨이 전자와 금속의 핵, 리간드의 핵, 기질 분자의 핵, 또는 억제제 분자의 핵 사이에 존재하므로 ENDOR 실험으로부터 얻은 정보는 우선 금속, 리간드, 기질 또는 억제제의 존재와 종류를 확인할 수 있다. 또한 좀 더 복잡한 분석에 의해 리간드, 기질 또는 억제제의 금속 센터에 대한 상대적인 위치와 화학 결합의 성격 등을 알아낼 수 있다.

IV. 전자 스핀 메아리 변조 (ESEEM, Electron Spin Echo Envelope Modulation)

그림 3(A)에서 v_a 와 v_b 의 값을 얻기 위하여 ENDOR 실험에서는 RF를 시료에 주사하고 EPR 신호의 세기를 관측하였다. ESEEM 실험에서는 RF를 주사하는 대신에 microwave를 펄스의 형태로 주사하여 v_a 와 v_b 의 정보를 얻는다.^{5,7,8} ESEEM 실험에서는 여러개의 microwave 펄스를 시료에 주사하여 전자 스핀 메아리를 유도한다. 그림 6은 2-pulse ESEEM, 3-pulse ESEEM 및 HYSCORE (hyperfine sublevel correlation spectroscopy)의 실험 방법을 개략적으로 그린 것이다. 그림에서와 같이 펄스 사이의 시간 간격을 변화시키면서 스핀 메아리의 세기를 관측하면 그 세기가 변화하는 것을 볼 수 있다. 세기의 값을 시간 축에서 보면 파 (wave)의 모양이 되는데 이 때 파의 주파수가 바로 v_a 와 v_b 이다. 따라서 이 데이터를 푸리에 변환 (Fourier transform)하면 ENDOR 스펙트럼과 비슷한 스펙트럼을 얻을 수 있다.

각각의 펄스 순서는 그 유용성 약간 다른데 2-pulse ESEEM은 초미세 상호작용이 매우 비등방성 (anisotropic)일 때 유용하게 쓰이고 3-pulse ESEEM은 해상도를 높이고 스펙트럼을 단순화하여 분석을 용이하게 할 수 있다. HYSCORE는 2-dimensional ESEEM으

로서 여러개의 신호가 복잡하게 겹쳐있을 때 그것을 분리하는데 쓰인다. ESEEM은 초미세 상호작용의 크기와 핵의 Larmor 주파수 그리고 핵 사중극자 상호작용의 크기가 서로 비슷할 때 매우 민감하게 그 크기들을 찾아낼 수 있다. ENDOR와 ESEEM은 원칙적으로는 같은 정보를 얻는 실험 방법이지만 서로 민감하게 반응하는 초미세 상호작용과 핵 사중극자 상호작용의 성격과 크기가 다르므로 상보적으로 사용되고 있다.

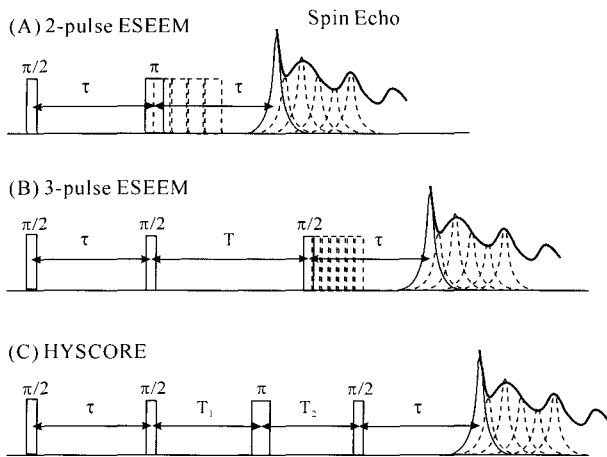


그림 6. (A) 2-pulse ESEEM, (B) 3-pulse ESEEM, (C) HYSORE의 펄스 순서와 스핀 메아리 세기의 변화. 2-pulse ESEEM에서는 τ , 2-pulse ESEEM에서는 T , HYSORE에서는 T_1 과 T_2 를 변화시키면서 메아리의 세기를 측정한다.^{5,6,8}

V. 금속 함유 효소의 연구에서 ENDOR와 ESEEM의 응용

Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{5+} , Mo^{3+} , Ni^{3+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , VO^{2+} , Fe-S cluster 및 그 밖의 많은 금속 함유 효소는 EPR 신호를 보이고 이들 효소의 활성 자리에 대한 연구에 ENDOR와 ESEEM가 매우 유용하게 쓰이고 있다. 본 란에서는 금속 함유 효소의 연구에 위의 분광법들이 어떻게 응용되고 있는가를 응용의 유형별로 간략히 정리한다.

1. 활성 자리에 있는 금속의 확인

금속 함유 효소에 있어서 가장 첫 번째 질문은 활성 자리에 있는 금속이 과연 어떤 것일까 하는 것이다. *Clostridium thermoaceticum*로부터 추출한 carbon monoxide dehydrogenase (CODH)의 경우에 ^{61}Ni ($I = 3/2$)와 ^{57}Fe ($I = 1/2$) ENDOR를 이용하여 금속 센터에 Fe의 cluster와 Ni이 있음을 밝혀내었다. 이는 후에 결정 구조를 밝히는데 중요한 역할을 하였다.^{13,14} 또한 nitrogenase의 MoFe protein의 M-center에 Mo가 있음을 ^{95}Mo ENDOR로부터 밝혀내기도 하였다.¹⁵ 자연 존재비에 따르면 Ni, Fe, Mo는 $I = 0$ 인 핵의 형태로 가장 많이 존재한다. 이들 금속을 위의 I 값이 0이 아닌 금속으로 치환하여 EPR 실험을 하면 외톨이 전자와 금속 핵 사이의 초미세 상호작용에 의해 EPR 흡수선이 넓어져서 그 존재를 확인할 수가 있으나 많은 경우에 상호작용의 크기가 크지 않아서 EPR로 확인할 수 없게 된다. ENDOR를 사용하면 이러한 경우에 ENDOR 신호의 관측으로부터 그 존재를 쉽게 확인할 수 있다.

금속 함유 효소에서 효소 작용중에 외톨이 전자의 위치가 금속이 아닌 다른 아미노산에 자유 라디칼의 형태로 있는 경우도 있다. 이때 라디칼 센터를 확인하는데 ^{14}N , ^1H ENDOR가 매우 유용하게 활용되며 cytochrom c peroxidase에서 자유 라디칼의 Trp를 찾아내었고 photosystem II에서 Tyr 라디칼을 확인하기도 하였다.¹⁶⁻¹⁷

2. 리간드의 확인

활성 자리의 금속을 알고난 후에 다음 질문은 금속의 리간드이다. 금속 함유 효소의 리간드는 거의 대부분의 경우에 ^{14}N ($I = 1$), ^1H ($I = 1/2$) ENDOR나 ESEEM로부터 확인할 수 있다. 예를 들어, heme protein에서 heme 주변의 환경을 ^{14}N , ^1H ENDOR로부터 연구한 결과들이 보고되어 있다.¹⁸⁻²⁰ 필요한 경우에는 ^{15}N ($I = 1/2$), ^2H ($I = 1$), ^{17}O ($I = 5/2$), ^{33}S ($I = 3/2$)로 치환하고 ENDOR나 ESEEM 실험을 통하여 그 존재와 상대적인 구조를 밝힐 수 있다.

Cu²⁺ 등을 포함한 금속 함유 효소에 있어서 histidine이 금속의 리간드로 있는 경우가 많이 관찰 된다. 이때 ¹⁴N ESEEM은 특히 유용하다. 이는 histidine이 imidazole의 질소 원자를 통하여 금속에 결합하여 있을 때 직접 붙어있지 않은 imidazole의 질소 원자의 ¹⁴N 초미세 상호작용의 크기와 X-band에서의 ¹⁴N Larmor 주파수가 비슷하여 핵 사중극자 상호작용이 매우 잘 분리되어 관측되기 때문이다.⁷ 이를 이용하여 superoxide dismutase,²¹ phenylalanine hydroxylase²² 등의 Cu²⁺를 포함하는 효소와 Rieske [2Fe-2S] cluster를 가지고 있는 cytochrome bc1 complex²³ 등에 있어서 histidine 리간드의 존재와 위치 및 갯수를 알아내기도 하였다. 또한 ¹⁴N ESEEM은 [Fe-S] cluster의 수소 결합을 관측 가능하게 함으로써 단백질의 매우 미세한 구조적 변화를 관찰할 수 있게 한다.²⁴

3. 기질 및 억제제의 금속 활성 자리에 대한 결합

다음의 질문은 기질이나 억제제가 과연 어떻게 활성 자리에 결합하는가 일 것이다. 때때로 이러한 분자가 금속에 결합하면 EPR 신호의 모양이 변화하기도 하지만 이 변화로부터는 위의 분자들이 어떻게 금속에 결합하여 있는가는 알기 어렵다. 이러한 경우에 결합에 대한 좀 더 자세한 정보를 ENDOR나 ESEEM을 통하여 얻을 수 있다.

예를 들어, resting state에 있는 nitrogenase의 MoFe protein으로부터는 활성 자리인 FeMo-cofactor에서 S = 2/3인 EPR 스펙트럼이 얻어지는데 억제제인 CO를 넣어주면 S = 1/2인 새로운 스펙트럼이 얻어진다.

(그림 7)

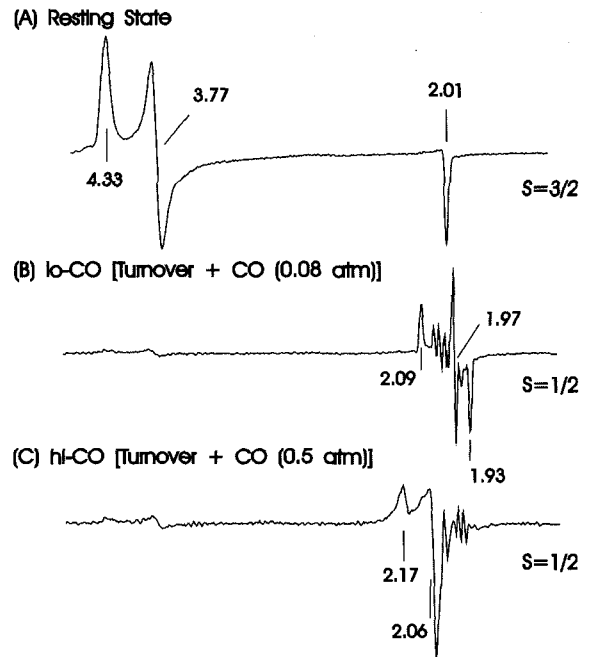


그림 7. Nitrogenase MoFe protein 으로부터 얻은 EPR 스펙트럼.²⁵

그러나, CO와 활성자리의 관계에 대한 자세한 정보를 EPR 신호로는 알 수가 없다. 이럴 때 ¹³CO (¹³C; I = 1/2)를 사용하여 시료를 준비하고 여러 자장에서 ENDOR 실험 (그림 8)을 하면 ¹³C의 초미세 상호작용의 텐서와 이 텐서의 g-factor에 대한 상대적인 방향을 알 수 있다.

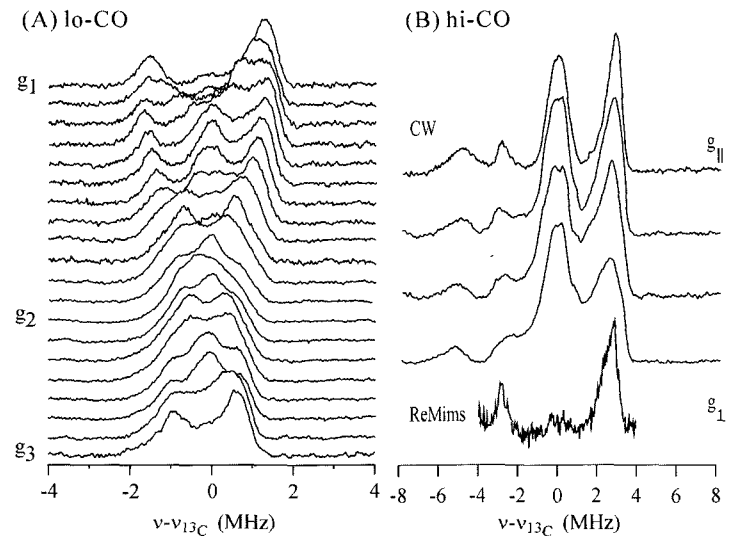


그림 8. Nitrogenase MoFe protein 의 (A) lo-CO 상태와 (B) hi-CO 상태에서 얻은 ^{13}C ENDOR 스펙트럼. lo-CO에서의 ^{13}C 의 초미세 상호작용 텐서는 [-2.0, 3.5, 2.0] MHz 이다. hi-CO에서는 두 종류의 ^{13}CO 가 관측되고 각각의 초미세 상호작용 텐서는 [5.8, 5.8, 4.5] MHz 와 [0.6, 0.6, 0.9] MHz.²⁵

이로부터 그림 9에서 처럼 FeMo-cofactor에 CO가 결합하는 모양을 예측할 수 있었다.²⁵

비슷한 예로서 aconitase의 기질로 작용하는 citrate의 산소 원자를 ^{17}O ($I = 5/2$)으로 치환하고 이의 ENDOR로부터 aconitase에 효소 작용에 의해 citrate가 isocitrate로 변하는 전 과정을 성공적으로 규명한 바가 있다.^{26,27} 또한 rebonucleotide reductase의 중간체 X 상태에서의 물 분자의 2Fe 센터에 대한 결합 구조

등이 ENDOR에 의하여 밝혀졌다.¹⁰ Mn catalase에서 ESEEM을 사용하여 활성 자리인 Mn(III)/Mn(IV) 센터에 대하여 억제제인 azide의 상대적인 위치를 예측한 보고도 있다.²⁸

VI. 결론

이상에서 몇가지 경우의 금속 함유 효소에서 활성 자리의 구조와 반응 기작등을 ENDOR와 ESEEM으로부터 알 수 있음을 보여주었다, ENDOR와 ESEEM의 큰 장점은 물에서 효소 작용이 일어나고 있는 어느 순간에 대하여 별다른 조치없이 바로 그 상태를 분광학적으로 볼 수 있다는 것이다. (반응 용액을 바로 얼려서 저온에서 실험을 한다) 따라서 다른 방법으로 얻을 수 없는 중요한 정보를 많이 얻을 수 있다. 그리고 펄스를 사용한 새로운 ENDOR와 ESEEM의 방법들이 계속

해서 개발되고 있고 이는 생물 분야에서 시료의 처리법의 발전과 더불어 앞으로도 이 분야의 연구에서 주요한 역할을 담당하리라고 예상된다. 끝으로, 참고 문헌 29에는 ESEEM을 사용하여 이제까지 연구된 많은 금속 함유 효소들의 예가 잘 정리되어 있다. 이 분광법에 대하여 익숙하지 않은 분들도 목차를 보면 대강은 어디에 응용을 하는지 알 수 있으리라 예상된다. 문헌 29에 언급된 효소들은 또한 거의 대부분의 경우에 ENDOR를 사용하여 연구되어오고 있다.

VII. 참고 문헌

1. Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* 1996, 96, 2239-2314.
2. Lippard, S. J.; Berg, J. M. *Principles of Bioinorganic Chemistry*; University Science Books: Mill Valley, 1994.
3. Abragam, B.; Bleaney, B. *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*, Clarendon Press: Oxford, 1970.
4. Pilbrow, J. R. *Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance*; Clarendon Press: Oxford, 1990.
5. Kevan, L.; Bowman, M. *Modern Pulsed and Continuous-Wave Electron Spin Resonance*; Wiley: New York, 1990.
6. Hoffman, B. M.; DeRose, V. J.; Doan, P. E.; Gurbiel, R. J.; Houseman, A. L. P.; Telser, J., *Metalloenzyme Active-Site Structure and Function through Multifrequency CW and Pulsed ENDOR in Biological Magnetic Resonance*; Berliner, L. J.; Reuben J., Ed.; Plenum Press: New York and London, 1993; Vol. 13, pp 151-218.
7. Dikanov, S. A.; Tsvetkov, Y. D. *Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy*; CRC Press: Boca Raton, 1992.
8. Schweiger, A.; Jeschke, G. *Principles of Pulse Electron*

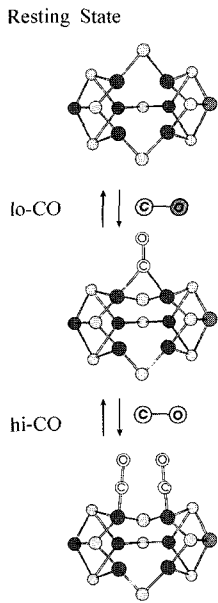


그림 9. ^{13}C ENDOR로부터 예측되는 CO의 FeMo-cofactor에 대한 결합의 모형.²⁵

- Paramagnetic Resonance; University Press: Oxford, 2001.
9. Mims, W. B.; Peisach, J. *Biol. Magn. Reson.* 1981, 3, 213-263.
10. Willems, J.-P.; Lee, H.-I.; Burdi, D.; Doan, P. E.; Stubbe, J.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 9816-9824.
11. Davies, E. R., *Phys. Lett.* 1974, 47A, 1.
12. Mims, W. B., *Proc. R. Soc. London A* 1965, 283, 452.
13. Fan, C. L.; Gorst, C. M.; Ragsdale, S. W.; Hoffman, B. M. *Biochemistry* (1991), 30, 431-435.
14. Drennan, C. L.; Heo, J.; Sintchak, M. D.; Schreiter, E.; Ludden, P. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001), 98, 11973-11978.
15. True, A. E.; Nelson, M. J.; Venters, R. A.; Orme-Johnson, W. H.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* (1988), 110, 1935-1943.
16. Sivaraja, M.; Goodin, D. B.; Smith, M.; Hoffman, B. M. *Science* 1989, 245, 738-740.
17. Barry, B. A.; Babcock, G. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987, 84, 7099-7103.
18. Scholes, C. P.; Lapidot, A.; Mascarenhas, R.; Inubushi, T.; Isaacson, R. A.; Feher, G., *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 2724-2735.
19. Fann, Y. C.; Ong, J. I.; Nocek, J. M.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 6109-6116.
20. Veselov, A. V.; Osborne, J. O.; Gennis, R. B.; Scholes, C. P., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 8712-8716.
21. Fee, J. A.; Peisach, J.; Mims, W. B. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 1910-1914.
22. McCracken, J.; Peisach, J.; Dooley, D. M., *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 4064-4072.
23. Britt, R. D.; Sauer, K.; Klein, M. P.; Knaff, D. B.; Kriauciunas, A.; Yu, C. A.; Yu, L.; Malkin, R., *Biochemistry* 1991, 30, 1892-1901.
24. Lee, H.-I.; Thrasher, K. S.; Dean, D. R.; Newton, W. E.; Hoffman, B. M., *Biochemistry* 1998, 37, 13370-13378.
25. Lee, H.-I.; Cameron, L. M.; Hales, B. J.; Hoffman, B. M., *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 10121-10126.
26. Kennedy, M. C.; Werst, M.; Telsner, J.; Emptage, M. H.; Beinert, H.; Hoffman, B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987, 84(24), 8854-8855.
27. Werst, M. M.; Kennedy, M. C.; Beinert, H.; Hoffman, B. M., *Biochemistry* 1990, 29, 10526-32.
28. Stemmler, T. L.; Sturgeon, B. E.; Randall, D. W.; Britt, R. D.; Penner-Hahn, J. E., *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 9215-9225.
29. Deligiannakis, Y.; Louloudi M.; Hadjiliadis, N., *Coord. Chem. Rev.* 2000, 204, 1-112.