

생물의료용 연 X-선현미경

X-선현미경은 생명현상을 나노단위의 구조와 기능적 본질을 탐구할 수 있는 첨단 현미경 영상장치이다. 이 글에서는 학제적으로 수행되어야 할 생명공학 연구를 위한 생물의료용 연 X-선현미경의 핵심기술을 알아보고, 이제까지의 연구동향에 대하여 간단히 소개한다.

김 경 우 / 원광대학교 X-선현미경연구센터, 책임연구원
 윤 권 하 / 원광대학교 의과대학 방사선과, 교수

e-mail : kwkim@wonkwang.ac.kr

e-mail : khy1646@wonkwang.ac.kr

1985년 린트겐에 의해 최초로 발견된 X-선은 투과력이 강하고, 파장이 짧은 전자기파이다. 우리들이 일상생활에서 눈으로 보고 있는 보통의 빛, 가시광은 카메라, 망원경, 현미경 등, 다양한 광학기계를 이용해 자연계의 영상을 만들고, 기록할 수 있다. 가시광과 마찬가지로 X-선도 빛과 같은 전자기이기 때문에 X-선을 이용하여 영상을 만들고, 기록하여 저장할 수 있다. X-선을 이용한 영상장치는 우주, 천체에서 인체, 공업재료, 미생물, 세포, 결정표면, 계면, 흡착물의 원자배열과 같은 초미세의 세계까지 탐구할 수 있는 영상장치이다. 더욱이 X-선 결상기술을 이용하게 되면 컴퓨터의 기억소자, 마이크로머신 등의 가공으로의 응용인 MEMS, NEMS 등이 가능하게 된다.

X-선현미경은 생명현상을 나노단위의 구조와 기능적 본질을 탐구할 수 있는 첨단 현미경 영상장치이다. X-선현미경을 실현시키기 위한 가장 중요한 기본요건의 하나가 현미경에 필요한 광원이다. 특히 생물의료용을 위한 현미경은 소위 '물의 창(water window)'이라고 하는 파장대의 X-선광원을 필요로 한다. 여기서 '물의 창'이라 함은 2.3~4.4nm (nm:10억 분의 1m)의 파장을 갖는 X-선이다.

'물의 창' X-선 영역을 포함하는 진공 극자외선의 주요한 특징은 (1) 원소에 따라 그 흡수 정도가 현격히 차이 나는 점이고 (2) 파장이 매우 짧으며 (3) 원자의 내각, 외각 전자와의 상호작용이 크다는 점이다. 이러한 특성들은 각기 21세기에 중요시되는 생명과학 및 의학 분야, 극고온, 극고압 상태의 물리 및 화학 동역학 연구 등 기초 분야와 차세대 반도체 소

자 제조 분야 등 산업 분야에 필요한 핵심 성질이다. 원소에 따라 흡수도가 크게 차이 나는 점은 생명과학 분야에서 매우 중요하게 사용될 수 있다. '물의 창' 영역에서 탄소의 흡수 계수가 산소에 비해서 10배 정도 크므로 이 영역의 X-선을 이용하여 영상을 얻는 경우 탄소와 산소를 쉽게 구분해 낼 수 있다. 살아 있는 세포를 구성하는 주된 원소는 탄소(단백질)와 산소(물)이다. 따라서, 이런 성질은 살아 있는 세포 내의 여러 조직 및 기관의 기능적 본질을 연구하는데 매우 중요하게 이용될 수 있다.

전통적으로 생명과학 분야에서 현미경이 매우 중요한 연구 기기인데 가시광선을 이용하는 광학현미경과 전자빔을 이용하는 전자현미경이 그 주된 것들이었다. 광학현미경의 경우 살아 있는 세포를 관찰할 수 있으나 사용되는 가시광선의 파장이 길므로 1 μ m 크기보다 작은 구조를 관찰하기가 거의 불가능하다. 진공 극자외선을 이용할 경우 그 파장이 10배 이상 짧으므로 0.1 μ m 이하의 구조를 능히 관찰할 수 있으며 자연적으로 존재하는 원소별 흡수도를 이용하므로 살아 있는 세포에 인위적 조작 없이 적용될 수 있다. 한편 전자현미경의 경우 1nm 크기 이하의 분해능을 제공하나 전자빔의 투과도가 매우 낮고, 원소별 구별성이 미약하므로 전자현미경으로 관찰하기 위해서는 세포를 얼리고, 100nm 두께로 자르는 등 사전 조치가 필요하다. 따라서 전자현미경으로는 살아 있는 세포를 관찰할 수가 없다. 따라서 지금까지는 0.1 μ m 이하의 분해능으로 살아있는 세포 내 기관의 활동에 관한 정보를 획득하기가 거의 불가능하였다. 그러나 물의 창 X-선현미경의 개발로 이런 정



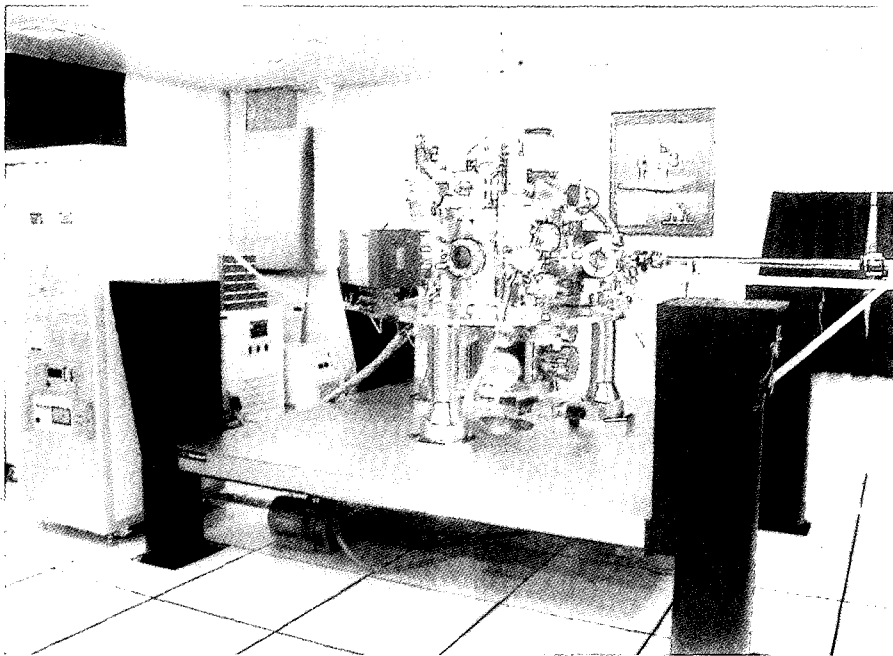
보가 제공될 수 있다. 특히 이런 정보는 유전자 조작 기술 등의 분자 생물학에 매우 유용하며 21세기에 는 분자 생물학이 중요해지는 만큼 위의 정보가 필수 불가결하리라 판단된다.

X-선현미경은 크게 세 가지로 나눌 수 있는데 초 정밀 나노가공기술을 이용한 반사거울, 굴절렌즈, 회절렌즈 등과 같은 X-선 광학계를 이용하여 X-선 을 집속시켜 시료의 상을 확대하여 얻는 방법 (imaging microscopy), 시료의 극부위치에 X-선을 조사하여 그 통과도를 검출하면서 시료를 스캐닝하고 전자장치를 이용하여 시료의 상을 실시간으로 얻을 수 있는 방법 (scanning microscopy), 시료를 레지스트 위에 밀착시켜 시료의 2 차원 영상을 1:1 비율로 얻는 방법(contact microscopy) 등이 있다.

X-선현미경은 21세기 생명공학연구에서 혁신적 인 도구로서 역할을 할 수 있다. 인간 게놈프로젝트 의 결과는 단백질의 기능 해석이 필수적으로 인식되 고 있으며, 게놈 수준에서부터 실제 생명 현상을 일 으키는 단백질의 영역에 이르는 광범위한 정보와 지 식의 통합이 이루어지는 이른바 포스트게놈(Post-

Genome)시대에는 단백질의 기능연구가 중요하 다. 프로티오믹스(단백질공학)를 통해 만들어진 단 백질들의 구조와 기능에 대한 정보는 새로운 치료 및 진단을 위한 타겟의 발굴에 매우 유용하다. 예로서 암세포의 이상 증식에 관여하는 단백질을 찾고 이의 기능을 억제하는 물질을 디자인함으로써 암을 비롯 한 각종 질병의 진행과정에 관여하는 요인들을 효율 적으로 찾을 수 있다면 이에 대한 치료나 예방 등이 가능해지며, 또한 의약품 단백질은 유전자요 법, 유 전자정보 해독 등 신규 단백질 또는 새로운 형태의 개량 단백질 개발이 이루어질 전망이다.

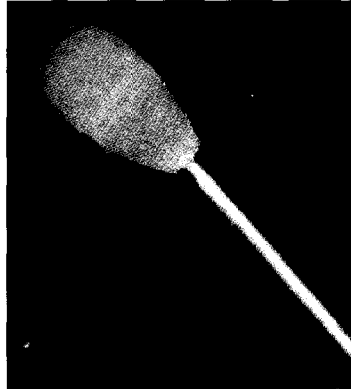
생체에서 기능성 단백질의 움직임이 생명현상을 해명하는 것은 분명하다고 보이며, 이들 기능성 단백 질은 수nm~수십nm 크기로 주위환경(산성도, 칼슘 농도, 이온 농도 등)의 미세한 변화에 따라 기능 과 움직임이 조절되며, 그 기능과 단백질 형상과는 밀접한 상호관계가 있다. 따라서, 기능성 단백질의 현미경적 관찰이 매우 중요하다. 또한, 유전자 연구 에 있어서도 DNA(deoxyribonucleic acid)에 보존된 정보에서 생체물질이 만들어지는 경우에 DNA의 수nm에서 수십nm까지의 형상적인 변화



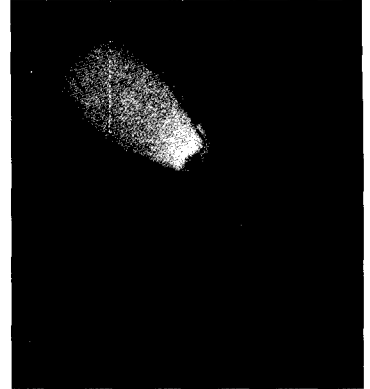
실험실 규모의 레이저 플라즈마 연 X-선현미경 시스템



Image@ $\lambda=4.268\text{nm}$
2 μm Bull sperm



Protein map



DNA map

싱크로트론을 이용한 X-선 영상 (미국, NSLS)

가 중요한 의미를 갖게 된다. 따라서 생체시료를 nm 크기로, 시료에 대한 가공을 하지 않고 살아 있는 상태로 관찰할 수 있는 X-선현미경 시스템의 중요성은 바로 여기에 있다.

X-선현미경은 '물의 창' 영역의 연 X-선을 발진시킬 수 있는 레이저 플라즈마 X-선 광원, 초정밀 나노가공기술과 초박막형성기술을 이용한 X-선 광학소자, 연 X-선을 검출할 수 있는 검출기 및 신호처리기술, 구조적으로 안정되며 나노제어 시스템 기술 등 핵심요소기술로 이루어지며, 핵심요소기술의 융합으로 시간적 공간적으로 우수한 분해능을 갖는 X-선현미경 시스템을 이룰 수 있다.

생물시료용 X-선현미경을 실현시킬 수 있는 광원은 원하는 파장 영역에서 강한 세기를 가져야 한다. 이러한 광원을 제공하는 것은 거대 과학장치를 이용하는 제3세대 방사광시설이나 X-선 레이저 등이 있으나 건설과 시설의 유지비용이 상당히 높고 시설의 이용 기회가 한정되어 실용적으로 접근이 어려워 생물연구로의 응용에 장애가 되고 있다. 레이저 플라즈마를 이용한 소형의 X-선 광원개발에 대한 노력이 전세계적으로 경쟁을 하면서 이루어지고 있다. 이러한 소형화된 광원개발은 고출력 레이저와 X-선 발생을 위한 타겟 시스템의 정교한 제작기술의 발달 등으로 현실적으로 이루어지고 있다. 플라즈마에서 발생된 X-선을 이용하는 현미경 장치에서는 플라즈마

에서 발생하는 X-선의 특성을 반드시 검사해야 한다. 이것은 현미경의 공간분해에 영향을 주는 X-선의 크기, 현미경의 노광 시간을 결정하는 X-선의 세기, 현미경의 정렬에 관련이 되는 X-선의 방향성, 현미경이 시료를 제대로 보는가에 관한 파장의 특성이 모두 관련이 되기 때문이다. 현재는 보다 높은 효율과 X-선현미경의 다양한 기능을 갖추기 위한 작업이 진행이 되고 있다.

광원으로부터 방사된 X-선원을 집광, 분광, 편광, 단색화 또는 결상시키기 위해서는 광학소자의 설계 및 가공이 매우 큰 역할을 한다. X-선 광학소자로는 반사를 이용하는 반사거울(reflective mirror)로서 전반사를 이용하는 경사입사거울과 수직입사를 이용하는 다층막거울이 있으며, 회절을 이용하는 존 플레이트, 굴절을 이용하는 굴절렌즈 등이 있다. 사용되는 X-선 광원의 파장이 매우 짧기 때문에 가시광과는 다른 구면수차, 비점수차, 코마수차 등이 적은 초정밀 X-선 광학소자를 필요로 한다. 특히 경사입사 반사거울의 경우에는 형상오차 100nm 이하, 표면 거칠기 RMS 1nm 이하의 비구면 형상을 필요로 하는 초정밀 가공 및 계측 기술의 향상이 필요하다. 연 X-선 영역에서의 다층막 코팅기술은 0.2%대의 균일성(uniformity)과 표면거칠기 RMS 0.3nm를 요구하며, 계면 안정성을 크게 요구한다. 이 기술의 확보는 그보다 파장이 긴 XUV

영역에서의 다층박막 코팅에 영향을 미쳐 이 영역대를 사용하는 차세대 반도체 리소그래피 산업에 커다란 기여를 하게 될 것이다.

최근 반도체 기술의 발전으로 CCD를 이용한 영상 검출 기술을 X-선 검출기로 적용하고 있다. X-선 검출기로는 X-선을 직접 검출하는 직접검출방식인 배면조사방식의 CCD 카메라가 있으며, 형광물질을 이용하여 가시광으로 변환하여 CCD로 검출하는 간접검출방식이 있다. 검출기에 X-선이 입사하게 되면 X-선의 위치정보와 에너지에 따른 정보를 얻을 수 있고, 실시간으로 X-선 영상을 얻을 수 있다. CCD는 일반적으로 축적형 검출기이기 때문에 시간 분해능이 그다지 좋지 않지만, 고해상도의 동영상을 획득하기 위하여 높은 이득 회로 설계 및 영상잡음을 최소화하기 위한 회로설계 및 냉각기술을 통하여 개선할 수 있으며, 최근 관련기술의 진보로 X-선 검출기의 성능에 많은 향상이 있다.

X-선현미경 시스템이 원하는 성능을 얻기 위해서 X-선 광원, X-선 광학소자, 시료, 검출기 등 광학계를 구성하는 광학 부품들이 설계된 위치에 정확히 놓여야 한다. 광학계의 오정렬은 X-선현미경 영상의 선명도 및 분해능 등을 손상시키는 원인이 되기 때문이다. 이들의 정렬을 위해 초정밀 구동 메커니즘, 측정, 계측 및 정렬 알고리즘의 개발과 이들의 통합 제어 등의 나노메카트로닉스 기술이 필요하며, 시스템의 안정적 운용을 위하여 진동에 대비한 방진 기술이 반드시 필요하다. 또한, 연 X-선은 대기 중에 흡수가 일어나므로 진공환경을 구축하는 등 학제간의 최첨단 기술이 융합된 융합기술을 필요로 한다.

현재까지의 X-선현미경에 대한 국내 연구는 매우 미미한 실정이며, 주로 방사광가속기를 이용한 연구가 진행 중이다. 포항공대와 포항가속기연구소에서는 연구용 목적으로 방사광 가속기 8A1 빔라인을 이용하여 7 μ m 폭의 극소광을 촬영해 50nm의 공간분해능을 갖는 연 X-선현미경을 개발하여 운영 중이며 세포와 신소재 연구 등으로의 응용에 적용할 계획이다. 또한, 포항공대와 포항가속기연구소에서는 1B2 빔라인을 이용하여 위상차(phase contrast)를 이용한 영상 획득 기법을 이용한 수 μ m의 공간 분해능을 갖는 경 X-선현미경을 개발 운영하

고 있다. 레이저 플라즈마를 이용한 실험실 규모의 X-선현미경 개발은 최근 원광대학교 X-선현미경 연구센터에서 생물의학적인 적용을 위한 시제품을 개발 중이다.

일본에서는 1988년부터 일본문부성의 중점영역 연구과제로 쓰쿠바 대학, 나고야 대학, 우주과학연구소, 일본원자력연구소, 핵융합과학연구소, RIKEN 등이 참여하여 X-선 결상광학에 관한 연구를 계속하고 있으며(약 2억 달러 투자), 이 과제의 일부로 X-선현미경 개발을 쓰쿠바 대학과 Nikon 사가 참여하여 해상도 50nm, 노출시간 300초의 프로토타입 X-선현미경을 1996년 제작하였다. 또한 가와사끼중공업(주)에서는 원자력연구소와 공동으로 X-선 광전자현미경을 개발하고 있는 중이며, 기반 기술로서 일본 Chubu 대학에서 X-선 망원경용 복제(replica) 비구면 반사경을 RMS 0.26nm로 가공하여 ASTRO- β 인공위성에 탑재 (1999년) 하였다.

미국에서는 1970년부터 National Science Foundation으로 SUNY Stony Brook에서 IBM과 공동으로 방사광가속기를 이용한 X-선현미경을 연구하여 스캐닝 방식의 X-선현미경 개발하였고, APS, SRC, ALS/Lawrence Berkley 등에서 생물학적 응용에 대한 연구를 활발히 수행 중이다.

유럽에서는 스웨덴의 Royal Institute of Technology의 Hertz 그룹, 영국의 King's college 에서 해상도 60nm, 노출시간 5분의 레이저기반 X-선현미경을 개발하였고, 독일의 Gottingen 대학, BESSY연구소, 덴마크의 ISA, 이탈리아의 ELETTRA 등에서 방사광가속기를 이용한 X-선현미경 연구에 박차를 가하고 있다.

위에서 서술한 바와 같이 X-선현미경은 21세기 포스트게놈시대에 나노기술과 방사선기술 등을 접목시켜 생명공학기술에 응용할 수 있는 미래지향적인 차세대 영상분석장비로서 발전하여 전세계 생명공학 분야의 개혁을 이룰 수 있는 핵심기술이 될 것이다.