

## High Resolution NMR Spectroscopy and Microscopy

정재준  
한국기초과학지원연구원

### 1. 서론

한국기초과학지원연구원(KBSI, 원장 강신원)은 충청북도 청원군 오창과학산업단지 내 KBSI 오창캠퍼스에 자기공명연구동을 올해 2월 준공하여 800 MHz NMR과 4.7 T 동물용 MRI, 그리고 상용 세계 최고급인 cryoprobe를 장착한 900 MHz (21.1 T) NMR을 설치·운영하여 앞으로 단백질체 구조연구 등의 분야에서 세계적 연구성과를 기대할 수 있게 되었다.

이와 같은 대형 연구장비를 활용한 바이오구조연구의 국가적 자원으로서의 역할을 수행하기 위해서 단백질체구조연구부의 자기공명팀과 미래융합연구실의 자기공명영상연구팀이 오창캠퍼스에 입주하여 자기공명분야 연구실을 구축할 예정이다. 이에 이 글을 통하여 국가적으로 공동활용 할 수 있는 장치들과 중점 연구분야들을 소개하고자 한다. 이들 연구 성과들은 국내의 많은 공동연구자들과의 협력결과임을 밝힌다.

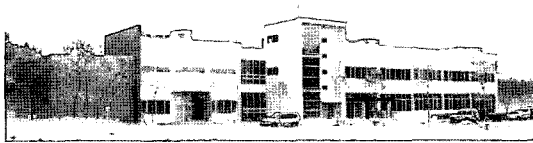


Fig. 1. KBSI 오창캠퍼스 자기공명연구동

### 2. 보유장비

본 연구실은 과학기술부에서 추진하고 있는 차세대자기공명장치 설치운영사업으로 올해 4월까지 900 MHz cryoprobe NMR, 800 MHz NMR, 600 MHz NMR, 500 MHz cryoprobe NMR 및 4.7 T MRI 장치를 오창캠퍼스에 설치하였다. 국내의 연구자들은 장치이용요령에 따라 독자적인 연구

로서 혹은 본 연구실과의 공동연구로서 이 국가적 대형 연구장치를 사용할 수 있다. 따라서 이들 장치에 대한 자세한 사양을 소개하여 사용자들의 이해를 돕고자 한다.

900MHz NMR에는  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -cryoprobe를 장착하여  $^1\text{H}$ 와  $^{13}\text{C}$ 의 감도를 보통보다 최고 3~4배 높은 신호를 얻을 수 있어서 수소핵 경우에는 S/N이 7000:1을 훨씬 넘어서 통상적인 600 MHz NMR의 감도인 900:1의 8배 이상이 된다. 감도만으로도 실험시간을 최소한 10배 이상 절약할 수 있을 뿐 아니라, 해상도도 자기장 세기만큼 좋아지기 때문에 단백질의 경우 분자량이 7~8만에 이르는 거대 단백질의 구조규명도 가능하다.

800 MHz NMR에는 마이크로이미징 장치를 장착하였다. 지금까지의 MRI 장치로서는 세계 최고(유일)의 자기장 세기(18.8 T)여서 고해상도 영상연구의 새로운 전기를 마련할 것을 기대하며 국내 관련 연구자들의 관심을 촉구한다. 또한 이 800 MHz NMR에는 XYZ-PFG probe를 장착하여 여러 가지 다양한 NMR 분석법을 시험할 수 있으며, 다양한 핵종에 대해서도 고자장 NMR 실험이 가능하다.

4.7 T 동물용 MRI는 horizontal bore로서 마우스, 쥐, 토끼, 고양이, 조그만 개(시료크기 20 cm) 등의 동물을 대상으로 MR 영상을 얻을 수 있는 본격적인 연구용 MRI 이다. 최근 활발해지고 있는 molecular imaging이나 각종 약물의 동물 시험 등 MR 관련한 많은 실험들이 가능한 장치이다. 이를 위해서 경사자장 장치도 각각 6, 12, 26cm 등으로 다양하게 준비하였다.

#### ■ 900 MHz NMR (Bruker)

- Magnet System
  - Field strength : 21.09 Tesla
  - Bore size : 54 mm
- Spectrometer Console

- 4 channels + deuterium channel
- PFG system : XYZ-gradient (10 A amplifier)
- Probes : Cryogenic  $1H\{^{13}C/^{15}N\}$  triple resonance probe ( $1H$  S/N=7000),  $1H\{^{13}C/^{15}N\}$  triple resonance probe ( $1H$  S/N=2000)

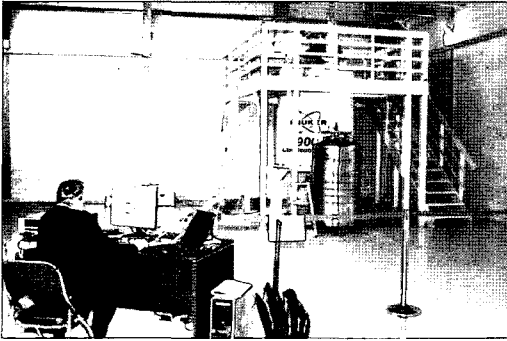


Fig. 2. KBSI 오창캠퍼스에 설치된 세계최고의 900 MHz NMR.

■ 800 MHz NMR (Bruker)

- Magnet System
  - Field strength : 18.8 Tesla
  - Bore size : 54 mm
- Spectrometer Console
  - 4 channels + deuterium channel
  - PFG system : XYZ-gradient (10 A amplifier)
- Probes :  $1H\{^{13}C/^{15}N\}$  triple resonance probe ( $1H$  S/N=1820),  $1H\{^{13}C/^{31}P\}$  triple resonance probe ( $1H$  S/N=1820),  $^{15}N\sim^{31}P\{1H\}$  probe ( $^{13}C$  S/N=400)
- Microimaging System



Fig. 3. KBSI 오창캠퍼스에 설치된 800 MHz NMR.

■ 4.7 T MRI (Bruker)

- Magnet System
  - Field strength : 4.7 Tesla
  - Bore size : 400 mm, horizontal
- Spectrometer Electronics
  - 2 channels
  - 3 Gradient systems
- Resonators :  $1H$  observe,  $1H/^{13}C$ ,  $1H/^{23}Na$ ,  $1H/^{31}P$ ,  $^{19}F/1H$  dual observe resonators
- Animal life monitoring and handling system
- RF shielding : Faraday cage

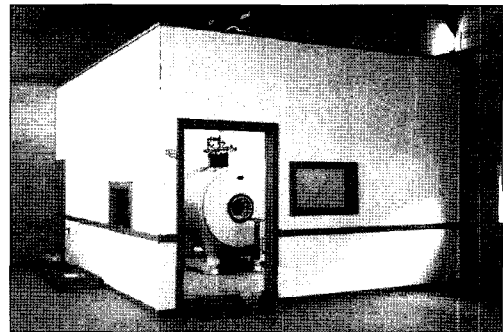


Fig. 4. KBSI 오창캠퍼스에 설치된 4.7 T 동물용 MRI.

■ 600 MHz NMR (Bruker)

- TXI(H/C/N) probehead
- Sensitivity > 900:1 for  $1H$
- 2D & 3D NMR 실험
- microimaging : 200 G/cm

■ 500 MHz Cryoprobe NMR (Bruker)

- Cryogenic TXI(H/C/N) probe
- Sensitivity > 3300:1 for  $1H$
- Sample changer : 60 개 시료 자동 교환측정
- 4 channel

그 외에도 300 MHz NMR, UV, CD 등의 공동활용 장치와 단백질 제조·정제장치 등을 보유하고 있다.

3. NMR Spectroscopy 연구

본 연구실이 국내 여러 연구실과 공동연구로 수행하고 있는 단백질 및 생체고분자 구조결정에 대한 연구결과들을 소개한다.

■ In Cell NMR 분석기법 개발

NMR spectroscopy는 수용액 상태에서 분자의 chemical structure 및 3D structure를 결정하는데 사용되고 있다. NMR은 생체분자를 physiological 또는 near-physiological 조건에서 고해상도로 관찰할 수 있는 장점이 있다.

최근 개발된 in cell NMR은 in vivo NMR이나 in vitro NMR과는 기술적으로 상당한 차이가 있으며 biological macromolecule의 cell 내부에서의 구조적 변화, cellular component와의 상호작용, post translational modification, binding event를 관찰 할 수 있다.

본 연구에서는 in cell NMR 측정을 위하여 단백질을 over expression 하고 over expression 된 단백질을 세포내에서 분석하기 위한 NMR 방법을 개발하였다. Cell 내에서의 단백질은 heterogenic environment에 있으며 세포내의 viscosity는 물에 비하여 1.5~2배 정도 크다. 따라서 in vitro에서와 같은 고분해능 스펙트럼

을 얻는 것이 어렵다. 또한 in cell내의 단백질 농도는 순수 분리 단백질처럼 농축할 수 없기 때문에 양이 제한되어 있다. 본 연구에서는 HR-MAS 및 cryoprobe를 이용하여 in cell 내의 단백질에 대한 고분해능 2D spectra를 국내 최초로 얻는데 성공하였다.

■ 비만 관련 단백질 3차원 구조 분석

ACC(acetyl-CoA carboxylase)는 대부분의 살아있는 유기체 fatty acid metabolism에 있어 중요한 역할을 하는 biotin-dependent enzyme이다. ACC는 acetyl-CoA가 malonyl-CoA가 되기 위한 carboxylation을 촉매 하는데, 인간과 포유류에는 서로 다른 2개의 ACC가 이성질체로 존재한다. ACC1의 경우 대개 lipogenic tissue에서 발현하며 긴 사슬의 지방산 생합성에 있어 속도 결정 단계를 촉매한다. 이에 비해 ACC2는 심장과 skeletal muscle에서 발현하며 이들 조직에서 malonyl-CoA가 지방산의 산화를 억제한다. 이와 같은 ACC가 drug discovery target으로서 중요한 이유는 ACC2 deficient mice의 실험으로 확인할 수 있는데 ACC2가 부족한 경우 심장과 skeletal muscle의 malonyl-CoA level이 현저하게 감소되며 이러한 malonyl-CoA 결핍의 결과 ACC2를 mutation한 mice의 경우 지속적으로 지방산이 산화되어 음식을 더 섭취하여도 체지방과 몸무게가 감소하는 현상을 나타내었다. 이것은 obesity, diabetes 그리고 다른 metabolic syndrome의 증상에 관련된 drug 개발에 있어 ACC가 target이 될 수 있음을 의미한다.

BCCP(biotin carboxyl carrier protein)는 carboxyl group을 전달하는데 있어 중요한 기능을 담당하는 ACC domain의 하나로 BCCP에 있는 lysine의 ammonium group과 biotin carboxyl 사이에 amide bond를 형성하여 BCCP에 biotin이 covalent하게 붙으며 'swinging arm' 양 쪽 끝에 놓여 CT와 BC의 active site 사이를 translocation 하는데 이용된다. 본 연구에서는 ACC2 domain의 BCCP 중 biotinylation되는 부분의 구조와 활성 부위를 파악함으로써 비만 치료제

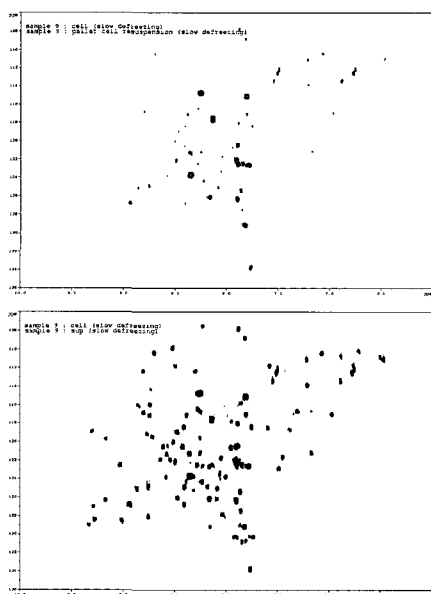


Fig. 5. Bccp를 과발현한 in cell NMR spectrum(상) 및 보통의 수용액 HSQC NMR spectrum

개발에 대한 기초 자료를 수집하였다.

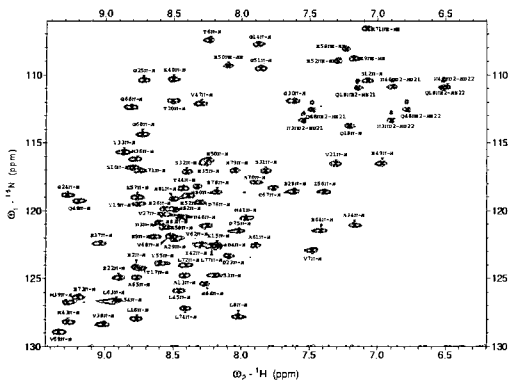


Fig. 6. BCCP 단백질의 NMR spectrum.



Fig. 7. NMR로 규명된 BCCP 단백질의 3차원적 입체구조.

□ 단백질구조 자동화 분석기법 개발

일본 RIKEN 연구소의 Dr. Guentert가 최근에 개발한 program은 NMR spectra로부터 automatic assignment and structure calculation이 가능한데, 그와의 공동연구를 통하여 이 프로그램을 최초로 실제 단백질 시료인 CDT1(replication licensing 관련 단백질)에 적용해서 구조를

구명하였다. Input으로 사용된 NMR spectrum들은  $^{15}\text{N}$  HSQC,  $^{13}\text{C}$  HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CB $\hat{\text{C}}$ A(CO)NH, HBHA(CO)NH, (H)CC(CO)NH, H(CCCO)NH, HCCH COSY, (H)CCH TOCSY, HCCH TOCSY,  $^{15}\text{N}$  edited NOESY,  $^{13}\text{C}$  edited NOESY로 이러한 spectrum들을 자동으로 분석해서 각 아미노산들의 chemical shift를 찾아내고 찾아진 chemical shift를 이용해서 자동으로 구조를 규명하였다. 통상적인 NMR을 이용한 구조 규명은 chemical shift assignment 그리고, NOE cross peak의 결정을 통한 restraint molecular dynamics를 이용하는데, 앞선 두 과정은 사람의 노력과 시간이 많이 들어가는 작업으로 구조 규명에 시간이 작게는 수개월 길게는 1년 이상이 들어가는 중요한 이유가 된다. Dr. Guentert의 프로그램은 앞의 두과정과 구조계산을 자동으로 해 주기 때문에 효율적인 protein structure 결정을 가능하게 해주었다.

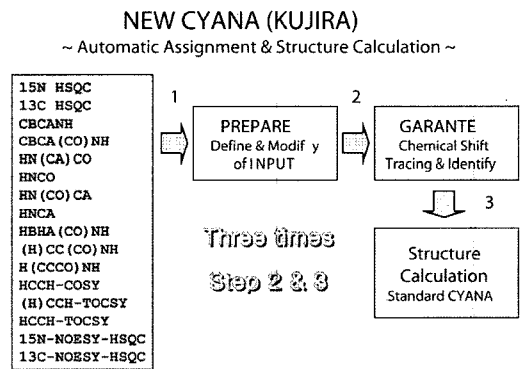


Fig. 8. 자동화된 구조계산 과정.

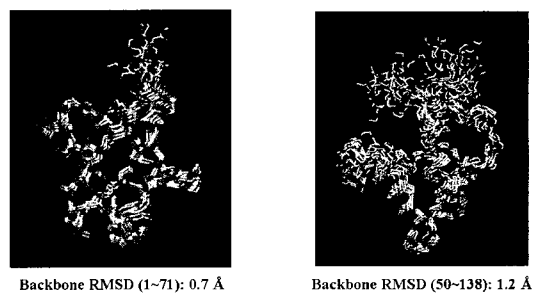


Fig. 9. 자동화된 구조계산 방법을 이용하여 규명한 CDT1 단백질의 3차원적 입체구조.

#### 4. NMR Microscopy 연구

최근의 고해상도 MRI 영상연구에 관한 본 연구실 연구결과를 소개하며 향후 4.7 T MRI를 활용하는 동물영상 연구결과도 소개할 수 있기를 기대한다.

##### ▣ Subcellular MR spectroscopy and microscopy

MRS(magnetic resonance spectroscopy)와 MRI(magnetic resonance imaging) 기법을 활용하여 살아있는 단일세포에 대한 연구를 수행하는 것은 지금까지 um 해상도를 얻기가 힘들어서 많은 연구자들이 주저하였다. 본 연구팀은 단일세포 연구에 필요한 해상도를 얻기 위해 고해상도 프로브를 자체개발하여 *Xenopus laevis*의 oocyte와 수정된 embryo를 MRI로 관찰하였다.

단일세포에서는 세계에서 가장 높은 해상도의 영상을 얻었고 세포 내 구조를 관찰할 수 있었다.

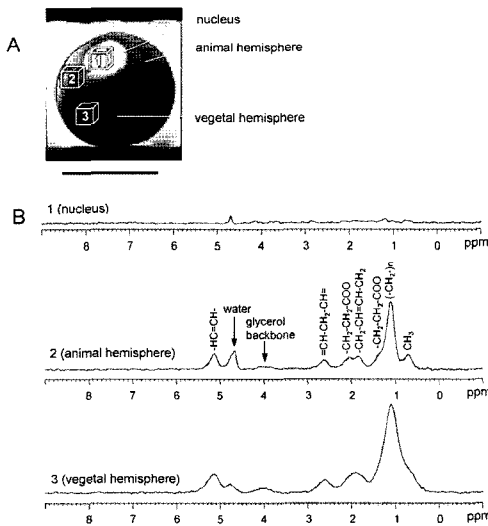


Fig.10. *Xenopus laevis* oocyte의 MRI 영상(A) 및 MR spectra(B)

Embryo 연구에서는 수정란이 올챙이가 될 때 까지 약 2일반을 MRI로 중단없이 계속적으로 관찰하였다. 또 MRS 기법을 활용하여 약물 투입시 세포의 각 부분에서의 약물 흡수 정도 등을 관찰하였다.

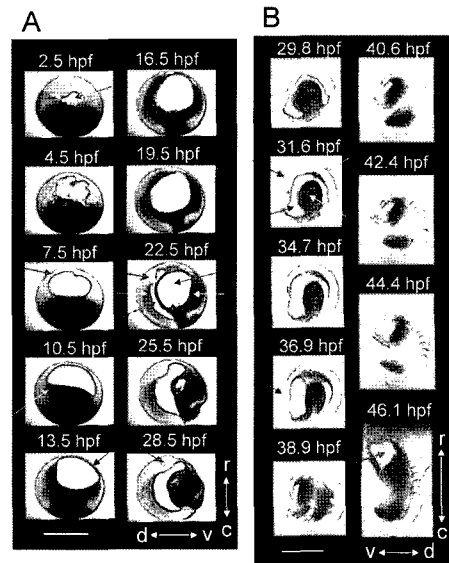


Fig. 11. *Xenopus laevis* 수정란의 MRI 영상.

#### 5. 운영체계

본 연구실의 장치들은 국가적 공동활용 장치로서 측정지원, 연구지원, 공동연구의 형태로 운영될 것이다. 측정지원은 소정의 분석료를 부가하며, 연구지원은 분석료 없이 우수한 연구결과가 도출될 것으로 판단되는 과제에 대하여 실험은 물론 데이터 해석에 본 연구원이 지원할 계획이다.

이밖에도 장치 활용을 활성화하기 위한 프로그램도 계획 중이다. 기기교육 프로그램으로 'operator 교육'에서는 국내 보급되어 있는 NMR 장치 사용자들의 올바른 사용법을 교육하겠다는 목표로 NMR 원리와 1차원 2차원 NMR 실험법등의 내용을 교육할 것이다. 또한 'International NMR School' 프로그램에서는 국내외의 저명한 학자를 초청하여 단기간에 NMR의 원리와 해석을 깊이 있게 이해하게 하고, 방학 기간을 이용할 계획이다. 아울러 때때로 필요한 워크샵을 개최하여 국내외 최신의 NMR을 이용한 연구결과를 소개하고 최신 연구기법들을 전파하도록 할 것이다.

참고로 이러한 국가적 대형 사업을 순조롭게 추진하고 많은 연구자들에게 활용할 수 있도록 알리기 위하여 이메일클럽("http://nmr.kbsi.re.kr/emailclub/")을 운영하고 있다. 여기서는 '차세대 NMR' 운

영과 관련하여 이메일 주소를 등록한 자료 구성하고 장치 운영 및 이용 등에 관한 소식을 우선 수신하며 운영 등에 관한 의견을 듣도록 하겠다.

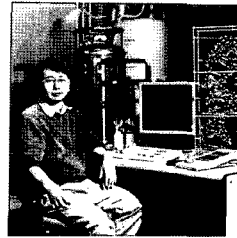
또한 원격 공동연구 시스템도 구축하였다. 웹을 통하여 실험중이거나 데이터를 처리할 때, 혹은 그에 대한 토의를 할 때 화상회의와 실험화면 공유기를 통하여 실시간으로 실험과 토의에 참여할 수 있는 시스템이다. ("<http://ics.kbsi.re.kr/>")

### 6. 결 론

앞으로 수 년 내에는 1 GHz NMR과 같은 더욱 높은 자기장의 장치도 개발될 것이고, NMR을 이용한 단백질 구조규명 연구가 활발히 추진되고 있어서 주요 단백질의 입체구조가 대부분 규명될 것이며, 여기에 필요한 기법들도 급속도로 개발될 것으로 예상된다. 아마도 지금까지 불가능했던 초거대 단백질이나 막 단백질 구조가 조만간 밝혀질 것이다. 이 차세대 자기공명장치 설치운영 사업의 성공적 수행은 이러한 새 패러다임의 첫 발자국으로 의미가 있을 것이다.

이에 본 연구실은 우리나라 바이오구조연구의 국가적 자원으로서의 역할을 수행하기 위하여 합리적이고 효율적인 장비와 인력의 활용, 조직 구축, 제도와 요령의 확립에 최선을 다 할 것이다. 아울러 국내 연구자들에게 필요한 파트너로서의 자격을 갖추도록 연구 능력 증대에도 한층 더 힘을 기울일 것이다. 공동활용과 고가 첨단 특수기기 운용에 경험이 많은 KBSI의 장치운동을 통하여 관련 연구의 세계적인 경쟁력을 확보할 것이다. 이를 위해 신기법 도입과 기가급 NMR 장치의 개발에 힘을 기울일 것이다. 이 과정에서 국내 관련학회의 적극적인 협력이 요청된다.

### 저자이력



정재준  
서울대 물리학과 (BS, 1984), UC Berkeley Biophysics (PhD, 1989), Yale Univ. (Damon Runyon postdoctoral fellow, 1990-1993), 한국기초과학지원연구원 선임/책임연구원 (1993-현재), 과학기술연합대학원대학교 생물분석과학 전공책임교수 (2004-현재)