

초저온 전자현미경법을 통한 고분해능 생물분자 구조분석

<https://doi.org/10.5757/vacmac.4.4.18>

현재경

High resolution structural analysis of biomolecules using cryo-electron microscopy

Jaekyung Hyun

Transmission electron microscopy (TEM) is a versatile and powerful technique that enables direct visualization of biological samples of sizes ranging from whole cell to near-atomic resolution details of a protein molecule. Thanks to numerous technical breakthroughs and monumental discoveries, 3D electron microscopy (3DEM) has become an indispensable tool in the field of structural biology. In particular, development of cryo-electron microscopy(cryo-EM) and computational image processing played pivotal role for the determination of 3D structures of complex biological systems at sub-molecular resolution. Here, basis of TEM and 3DEM will be introduced, especially focusing on technical advancements and practical applications. Also, future prospective of constantly evolving 3DEM field will be discussed, with an anticipation of great biological discoveries that were once considered impossible.

서론: 생물시료의 전자현미경 분석

투과전자현미경(transmission electron microscope, EM)은 Rayleigh 산란 법칙에 기반하여 가시광선보다 짧

은 파장을 가지는 전자선을 광원으로 하는 고분해능 영상 장비로써, 1930년대 초 독일의 Ernst Ruska에 의해 발명된 이후로 재료공학, 화학, 생물학을 비롯한 다양한 연구분야에서 필수적인 영상장비로 활용되고 있다 [1]. 특히 생물학에 있어서, 세포 및 소기관의 내부구조에서부터 단백질의 분자구조까지 다양한 미세구조 영역을 어우를 수 있다는 점에서 타 영상장비 또는 구조생물학적 분석기술에 비해 차별화 된다. 또한 2차원적으로 투영되는 TEM 영상을 조합하여 시료의 3차원적인 구조를 재건하는 3차원 분석기술(3D electron microscopy, 3DEM)은 장비 본연의 한계를 뛰어넘은 예라고 할 수 있다 [2]. 1970년대부터 이러한 3DEM의 가장 핵심 기술인 초저온전자현미경(cryo-electron microscopy, cryo-EM) 단입자 분석법(single particle analysis)의 개발이 꾸준히 진행되고 있으며 최근에는 원자수준으로 단백질 구조를 규명할 수 있는 수준으로 발전됨은 물론 [3], cryo-EM 기술 개발에 기여한 공로로 Richard Henderson, Jacques Dubochet 및 Joachim Frank가 2017년 노벨화학상을 수상하여 세계적으로 인정받는 생물 영상기술로 각광받고 있다.

Cryo-EM 기술은 경통 내부가 진공상태로 유지되는



<저자 약력>

현재경 박사는 2010년 뉴질랜드 University of Auckland에서 생물학 박사학위를 받았으며, 2011년부터 한국기초과학지원연구원 전자현미경연구부 선임연구원으로 재직 중이다 (hjk002@kbsi.re.kr).

TEM의 구조적 특성과 전자선에 의한 시료의 방사선 손상을 비롯한 생물시료의 고분해능 영상분석에 제한적인 요소들을 극복할 수 있도록 고안된 방법으로서는 크게는 급속동결을 통한 시료의 유리화(vitrification), 초저온으로 고상화된 시료의 비침습적 영상 획득, 그리고 전산처리를 통한 고분해능 3차 구조 재건 순으로 진행된다. 본 논문에서는 TEM의 구조에 대한 소개를 비롯하여, cryo-EM 분석기술의 소개, 최근 발전동향 및 향후 발전 가능성을 살펴보도록 하겠다.

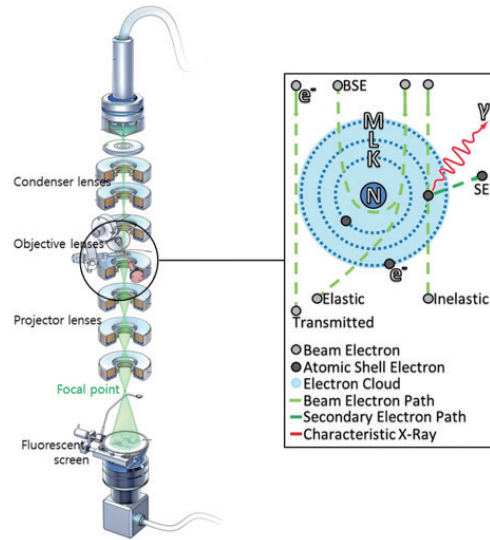
투과전자현미경

투과전자현미경은 파동성과 하전 입자(charged particle)의 성질을 가지고 있는 전자선을 광원으로 사용하며, Ernst Abbe가 정립한 영상장비 광원의 파장(wavelength)은 영상의 분해능(resolution)과 비례한다는 법칙을 기반으로 하여 아래와 같이 Louis de Broglie가 제안한 공식과 같이 고전압으로 가속된 전자선을 사용할 때 이론적으로 수백 나노미터(10^{-9} 미터)의 분해능을 가지는 광학현미경에 비해 수 피코미터(10^{-12} 미터)의 분해능을 구현할 수 있다는 사실에 바탕을 두고 있다.

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{h}{\sqrt{2mE(1 + \frac{E}{2mc^2})}}$$

여기서 E는 가속전압의 에너지(eV), h는 Planck 상수(6.626×10^{-34} J·s), m은 전자의 질량(9.109×10^{-31} kg), v는 가속전자의 속도(m/s), 그리고 c는 진공 내에서 빛의 속도(2.998×10^8 m/s)에 해당한다.

기본적인 전자현미경의 구조 및 신호 생성 원리는 그림 1과 같다. 전자선을 생성하기 위해 일반적으로 텅스텐 또는 lanthanum hexaboride(LaB₆) 필라멘트에 전류를 흘려주고 열을 가해 전자의 일함수(work function)를 초과하여 전자를 방출시키는 열방출형 전자총(thermionic gun)을 사용하지만, 최근에는 원자수준의 무기물 시료 분석은 물론 cryo-EM을 통한 고분해능 영상을 구현하기 위해 보다 밝고 전자선의 균일성(coherency)이 높은 전계방출형 전자총(field emission gun, FEG)이 주로 활용된다. 여기서 FEG의 경우 최대 10^{-6} (Schottkey FEG)에서 10^{-9} Pa(Cold FEG)의 고진공이 요구되므로 전자총 자체에 고진공 펌프가 장착되어 있다. 전자선은 이동



[Fig. 1] Schematic illustration of a transmission electron microscope and the interaction between the incoming electrons and the atom of the specimen

경로에 물분자 또는 탄화수소와 같은 불순물에 의해 쉽게 산란되기 때문에 TEM의 경통은 항시 고진공으로 유지되는 것이 필수적이며, 따라서 시료는 다양한 방법으로 건조한 후에 10^{-5} Pa 이상의 고진공(저압)으로 유지되는 TEM으로 삽입하여 관찰해야만 한다. 이를 위해 회전 펌프(rotary pump), 유확산펌프(oil diffusion pump), 터보펌프(turbomolecular pump) 및 이온게터펌프(ion getter pump)를 사용하여 순차적으로 TEM 내부의 고진공 상태를 만들어내고 유지한다. 가속된 전자선은 자장을 생성하여 전자선을 휘게 만드는 자계렌즈(magnetic lens) 및 전향장치(deflector)로 제어하고, 렌즈 하단에 위치하는 조리개(aperture)를 통해 선택적으로 산란된 전자선을 걸러낼 수 있다. 렌즈 시스템은 크게 전자총에서 방출되는 전자선을 수렴하는 집속렌즈(condenser lens), 전자선을 시료에 가해주고 일차적으로 전자신호를 집속하는 대물렌즈(objective lens) 및 시료에 의해 산란된 전자선을 교차시켜 배율을 증가시키는 중간렌즈(intermediate lens)와 투사렌즈(projection lens)로 구성되어 있다. 최종적으로 시료와 가속전자 간의 상호작용에서 생성되는 다양한 신호의 검출기(detector)를 통해 전자신호를 영상화 하거나 디지털 영상으로 저장할 수 있는데, 단순한 영상의 시각화를 위해서는 전자신호에 따라 형광을 발생하는 형광판을 사용하지만 영상 저장의 매개

체로는 사진필름(photographic film), 전하결합소자 카메라(charge-coupled device camera, CCD camera) 또는 비교적 최근에 개발된 고감도 직접검출소자 카메라(direct detector device camera, DDD camera)가 사용된다.

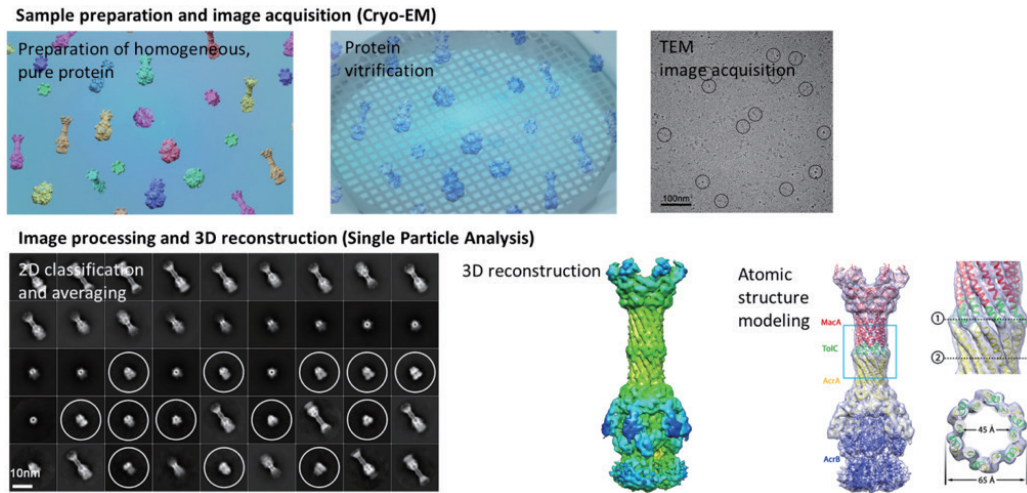
초저온전자현미경 기술

위에서 소개한 바와 같이 TEM의 구조 및 작동원리 상 수분을 함유하고 있는 생물시료를 영상화하기에는 많은 어려움이 따른다. 첫째로는 전자선에 의한 시료의 파괴인데, 일반적으로 전자선에 의한 시료의 손상은 열손상(thermal damage), 가속전자에 의해 원자가 손실되는 녹아웃 손상(knock out damage), 그리고 방사선 손상(radiation damage)로 나뉜다. 이러한 손상 중 섬세한 생화학적 작용을 통해 유지되는 생물분자의 경우 가해지는 고에너지 전자에 의한 방사선 손상에 의해 화학결합이 파괴되는데, 극소량의 전자밀도($>10\sim 20 e^-/\text{\AA}^2$) 이상으로 전자선을 조사할 경우 그 구조가 변질되어 버리므로 생물시료 분석에 있어 의한 가장 심각한 문제점으로 꼽을 수 있다 [4]. 이와 같은 맥락으로, 생물시료를 구성하는 경원소(탄소, 수소, 산소, 질소, 등)에 의한 낮은 전자산란은 영상의 낮은 명암대비로 이어지게 되며 특히 위와 같은 낮은 전자밀도의 영상조건에서는 고분해능 정보를 유지하고 있는 영상 데이터 수집이 어렵다. 두번째 문제점은 TEM 내부의 고진공 환경에 따른 시료의 준비의 제약이다. 생물시료의 경우 수분이 제거될 경우 본연의 구조를 유지하지 못하기 때문에 자연상태의 고분해능 구조 관찰이 불가능 하다. 이와 같은 문제점들을 해소하기 위해 1980년대 초반 까지는 생물시료들을 우라늄 또는 텅스텐이 포함된 중원소 물질로 염색한 후 건조하여 관찰함으로써 영상의 명암대비를 높이고 전자빔에 대한 방사선 손상을 최소화 하였다. 그러나 염색 전처리를 통해 준비된 시료는 여전히 건조과정을 통해 그 구조가 변질되었으므로 자연상태의 구조분석이 어려울뿐더러 시료를 감싸고 있는 염색분자에 의한 전자산란으로 영상을 얻기 때문에 다소 왜곡된 구조적 정보를 얻을 수 있다 [5].

1980년대 초에 European Molecular Biology Laboratory(EMBL)의 Jacques Dubochet와 동료들에 의해 개발된 cryo-EM은 급속도로 초저온에 액체를 동

결시킬 경우 비정질의 유리화된 얼음이 생성된다는 현상에 착안된 기술로써, 일반적으로 액체를 저온으로 얼릴 때 전자선의 투과가 어려운 얼음결정이 생성되지만 액체질소 온도(-196°C)까지 10^{6°C/s 이상의 온도감소율로 동결고정 시킬 때 단백질 또는 바이러스를 비롯한 미세 시료를 비침습적으로 보존할 수 있다 [6]. 동결고정된 시료는 이후 액체질소 온도로 유지시켜 온도상승에 의한 얼음결정 재생성을 방지하고 TEM 내부에서 역시 특수 홀더의 사용을 통해 초저온을 유지시킨 상태에서 영상을 획득할 수 있다. 따라서 고진공의 TEM 환경에서도 시료가 여전히 수분을 함유한 상태로 고상화 되어 분석이 가능해진 것이다. 또한 초저온 시료에 낮은 전자밀도의 전자선을 가해 영상을 얻어내는 영상기술(low dose imaging)이 개발되어 비파괴적으로 생물시료의 관찰이 가능해졌다.

그럼에도 최종적으로 기록되는 영상은 여전히 낮은 명암대비와 신호대비잡음비(signal-to-noise ratio) 때문에 원천 영상 데이터에서 생물시료의 고분해능 정보를 획득하는 것이 불가능했다. 이를 해소하기 위해 1980년대에 Joachim Frank는 동일한 시료(입자)의 영상을 다수 획득한 후 입자간의 유사성을 기반으로 분류하여 공통적으로 얻어지는 신호는 평균화하고 불규칙적인 잡음은 상쇄시켜 신호대비잡음비를 극대화시키는 단일자분석법 알고리즘을 개발하고 컴퓨터 소프트웨어에 적용시킴은 물론 [7], 영상의 명암대비를 높이기 위해 탈초점(defocus) 조건에서 얻어진 영상 데이터를 푸리에 변환(Fourier transform) 하였을 때 일괄적으로 왜곡현상을 야기시키는 명암대비 변환함수(contrast transfer function, CTF)를 계산함으로써 고분해능 정보의 왜곡을 보정할 수 있는 알고리즘을 적용하여 불완전한 cryo-EM 영상에서 최대한의 영상정보를 추출할 수 있는 기반을 마련하였다 [8]. 2차원적인 TEM 영상에서 미세 생물시료의 3차 구조를 재건하는 3DEM 전산기술은 이미 1960년대 후반에 영국 Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology(MRC LMB) 연구소의 Richard Henderson을 비롯한 선구자들에 의해 개발된 바 있으나 [9], cryo-EM 기술의 보급과 더불어 TEM 성능 향상, 고감도 카메라 개발 및 추가적인 전산처리 알고리즘의 개발에 힘입어 최근 원자 수준의 고분해능 단백질 3차구조 분석기술로써 발전하게 되었다 (그림 2).



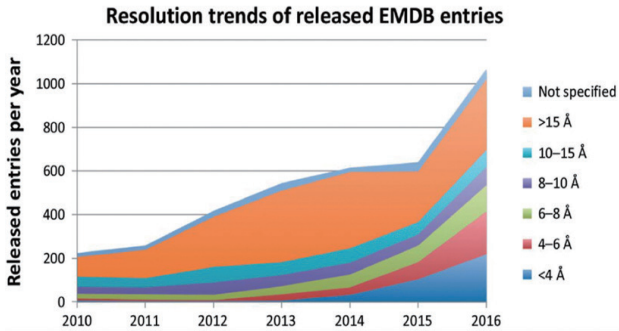
[Fig. 2] Schematic illustration of cryo-EM single particle analysis workflow

Cryo-EM의 최근 발전 동향

지난 반세기 동안 균일한 빔을 생성하는 FEG 광원, 렌즈 시스템의 보완, 구면수차(spherical aberration) 및 색수차(chromatic aberration) 보정기, 비탄성 전자 여과기(energy filter) 등 TEM의 광학적인 발전과 보급은 꾸준히 이루어졌음에도 낮은 밀도의 전자선을 사용하는 제한성 때문에 cryo-EM의 고분해능 분석은 개발 이후 30여년동안 상당히 더디게 진행되었다. 단백질 시료의 원자수준 cryo-EM 구조분석이 활성화 된 것은 불과 5년 정도에 지나지 않으며, 이와 같은 혁신은 DDD 카메라의 개발에 기인한다 [10]. 근본적으로 낮은 전자밀도로 촬영된 cryo-EM 영상을 기존의 사진필름 또는 CCD 카메라로 검출할 경우 대다수의 분해능 정보가 손실되는 반면 검출양자효율(detective quantum efficiency)이 월등히 뛰어난 고감도 DDD 카메라를 사용하여 얻어지는 원천 영상의 저분해능 및 고분해능 정보의 함유율이 높아지기 때문이다. 뿐만 아니라 고체촬상소자(complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS) 회로를 이용하여 빠른 속도로 전자를 검출하는 것이 가능해짐으로써, 1~2초간의 전자선 노출 시간 동안 동일한 시료 영역에서 수십 개의 영상을 연사하여 동영상과 같은 형태로 데이터를 수집할 수 있다. 이를 통해 모든 동영상 프레임을 하나의 기준점으로 이동하여 미세한 시료의 움직임을 보정할 수 있으므로 기존의 영상 떨림(drift)에 의해 손실된 고분해

능 정보를 복원할 수 있게 되었다 [11].

DDD 카메라와 영상의 움직임 보정(motion correction) 알고리즘이 보급된 2013년을 기준으로 단백질 복합체 준원자수준($<4\text{\AA}$)의 cryo-EM 구조분석 사례가 급증하고, 원자수준($<2\text{\AA}$)의 구조분석 또한 가능하게 되었다 (그림 3). 이를 비롯하여 용액상에서 다양한 형태로 존재하는 단백질의 구조적 다양성을 전산처리로 분리시켜 각 형태의 고분해능 구조를 규명하는 알고리즘이 개발됨은 물론 [12], 기존에는 불가능하다고 여겨졌던 저분자량 단백질($<100\text{kDa}$) 단백질의 구조 또한 위상판(phase plate) 사용을 통한 영상의 명암대비 향상을 통해 실현되었다 [13]. 이렇게 cryo-EM이 각광 받는 이유는 단순히 기술적인 개발을 뛰어넘어, 기존에 x-선 결정학 또는 핵자기공명분광학과 같은 구조생물학 기술을 통해 얻기 어려웠던 거대 단백질 복합체 구조를 규명하여 실제 상황과 유사한 단백질간의 상호작용을 규명할 수 있는 이유에서 이다. 특히나 팔목할 만한 점은 질병과 밀접한 관련이 있는 다수의 단백질 복합체의 cryo-EM 분석이 가능해 짐으로써 발병기작의 이해도 향상, 그리고 더 나아가서는 신약 개발의 중요한 구조생물학적 단서를 제공할 수 있는 점이다. 최근 발표된 다양한 막단백질의 구조 [14], 지카 바이러스를 비롯한 감염성 병원균 및 감염기작에 중추적인 역할을 담당하는 단백질의 원자구조 [15] 그리고 퇴행성 뇌질환과 관련된 생분자의 구조 [16]의 규명 사례들이 이러한 추세를 반영하고 있다.



[Fig. 3] Recent trend in achievable resolution of cryo-EM structure determination

Cryo-EM의 향후 발전 가능성

현재 cryo-EM은 최고의 호황기를 맞고 있지만 기술적인 제약은 여전히 존재한다. 특히 단일자분석법을 적용하기 위해서는 동일한 구조를 가지는 단백질 입자를 대량으로 분리·정제하여야 하는 전제조건이 있을 뿐만 아니라 고분해능 분석에 적합한 비정질 얼음을 가지는 초저온 시료의 준비단계에서도 병목현상이 존재한다. 또한 기본적으로 고진공 환경에서의 분석을 위한 건조 또는 동결과 같은 고상화 전처리에 의해 구현이 어려운 액상시료에서 시료의 분자동역학적 분석 또한 난제로 남아있다. 그럼에도 불구하고 특정한 피사체를 다양한 각도로 회전시켜 3차원적인 구조를 복원하는 전자토폰로그래피 기반의 in situ 영상분석 [17] 및 영상 데이터 기반의 분자동역학적 모사를 위한 전산처리 알고리즘들이 개발되고 있다 [18].

아쉽게도 미국, 유럽, 일본, 중국 등에 위치한 선도 연구그룹에 비해 국내 cryo-EM 기술은 2000년대 말 체계적으로 도입되어 그 수준은 아직 걸음마 단계에 있으며, 고성능 cryo-EM 전용 TEM 장비를 비롯한 효율적인 스크리닝 장비의 도입, 영상분석 전문가 양성 및 연구 인프라 확대가 절실히 필요한 상황이다. 그러나 최근 국내에서도 cryo-EM을 통한 단백질 구조규명 결과가 도출되고 있으며 [19], 특히 한국기초과학지원연구원에 DDD 카메라가 탑재된 고성능 cryo-EM 장비(Titan Krios, Thermo Fisher Scientific, Inc.)이 가동되고 많은 연구자들이 cryo-EM 기술에 관심을 가지게 됨으로써 빠른 속도로 세계적인 경쟁력을 축적하고 있다 [20].

결론

Cryo-EM의 개발은 진공을 기반으로 하는 고분해능 영상장비인 TEM을 사용하여 생물시료를 분석 할 때 발생하는 다양한 한계를 극복한 연구개발의 산물이라 할 수 있다. Cryo-EM을 통해 기존에는 불가능하게 여겨졌던 복잡한 생체기작의 연구들이 활발히 진행되고 있으며 원천기술 또한 빠르게 발전하고 있어 앞으로도 수많은 기념비적 기술개발을 기대할 수 있다.

References

- [1] D.B. Williams and C.B. Carter, Transmission electron microscopy: , 2 ed. (Springer US, 2009).
- [2] J. Hyun and H.S. Jung, Biodesign 1, 13 (2013).
- [3] E. Nogales, Nature methods 13 (1), 24 (2016).
- [4] R. F. Egerton, P. Li, and M. Malac, Micron 35 (6), 399 (2004).
- [5] M. Ohi, Y. Li, Y. Cheng, and T. Walz, Biological procedures online 6, 23 (2004).
- [6] J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell, and P. Schultz, Quarterly reviews of biophysics 21 (2), 129 (1988).
- [7] J. Frank, A. Verschoor, and M. Boublik, Science 214 (4527), 1353 (1981).
- [8] J. A. Mindell and N. Grigorieff, Journal of structural biology 142 (3), 334 (2003).
- [9] D. J. De Rosier and A. Klug, Nature 217 (5124), 130 (1968); R. Henderson and P.N. Unwin, Biophysics of structure and mechanism 3 (2), 121 (1977).
- [10] X. Li, P. Mooney, S. Zheng, C. R. Booth, M. B. Braumfeld, S. Gubbens, D. A. Agard, and Y. Cheng, Nature methods 10 (6), 584 (2013); B. E. Bammes, R. H. Rochat, J. Jakana, D. H. Chen, and W. Chiu, Journal of structural biology 177 (3), 589 (2012).
- [11] X. C. Bai, I. S. Fernandez, G. McMullan, and S. H. Scheres, eLife 2, e00461 (2013).
- [12] S. H. Scheres, Methods in enzymology 579, 125 (2016).
- [13] R. Danev, D. Tegunov, and W. Baumeister, eLife 6 (2017).
- [14] Y. L. Liang, M. Khoshouei, M. Radjainia, Y. Zhang, A. Glukhova, J. Tarrasch, D. M. Thal, S. G. B. Furness, G. Christopoulos, T. Coudrat, R. Danev, W. Baumeister, L. J. Miller, A. Christopoulos, B. K. Kobilka, D. Wooten, G. Skiniotis, and P. M. Sexton, Nature 546 (7656), 118 (2017).
- [15] S. S. Hasan, A. Miller, G. Sapparapu, E. Fernandez, T. Klose, F. Long, A. Fokine, J. C. Porta, W. Jiang, M. S. Diamond, J. E. Crowe, Jr., R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann, Nature communications 8, 14722 (2017).
- [16] A. W. P. Fitzpatrick, B. Falcon, S. He, A. G. Murzin, G. Murshudov, H. J. Garringer, R. A. Crowther, B. Ghetti, M. Goedert, and S. H. W. Scheres, Nature 547 (7662), 185 (2017).
- [17] J. A. Briggs, Current opinion in structural biology 23 (2), 261 (2013).
- [18] J. Frank and A. Ourmazd, Methods 100, 61 (2016).
- [19] H. Jeong, J. S. Kim, S. Song, H. Shigematsu, T. Yokoyama, J. Hyun, and N. C. Ha, Structure 24 (2), 272 (2016).
- [20] H. Jeong, S.-G. Lee, H.-S. Kweon, and J. Hyun, Biodesign 5 (3), 96 (2017).