

중성자 산란을 이용한 생체물질의 구조 연구 : 단백질의 생체유사막의 흡착

신관우, M.H.Rafailovich, J. Sokolov, N.Pernodet, S.K.Satija
광주과학기술원 신소재공학과 극미세 및 생체 유기박막 연구실, SUNY, NIST
전화 (062)970-2321 FAX (062)970-2304

(Abstract) We have shown that it is possible to form a fibrillar network of fibronectin on a polyelectrolyte polymer film whose dimensions are similar to those reported on the extra cellular matrix. The fibronectin network was observed to form only when the charge density of the polymer was in excess of the natural charge density of the cell wall. Furthermore, the self-organized fibronectin layer was much thicker than the polymer film, indicating that long ranged interaction may play a key role in the assembly process. It is therefore important to understand the structure of the polymer layer/protein interface. Here we report on a neutron reflectivity study where we explore the structure of the polyelectrolyte layer, in this case sulfonated polystyrene (PSSx.), with varying degree of sulfonation ($x < 30\%$), as a function of sulfur content and counter ion concentration. These results are then correlated with systemic study of the adsorption and the multilayer formation of fibronectin as a function of incubation time for various sulfonation levels of PSSx.¹

중성자를 이용한 생체 구조의 측정

광학의 반사, 굴절, 그리고 회절 등의 원리를 이용한 중성자 반사율 측정장치는 최근 몇 년간 연성물질 (complex fluid), 자성체, 고분자 및 생체물질 (bio-materials) 등의 구조 표면과 계면에 관련된 연구에 폭 넓게 사용되고 있다.² 이론적으로 다양한 길이의 파장의 입사선이 사용되어질 수 있으나, 최근의 극미세 구조(nanostructure)와 생체물질의 연구에 있어서 특히, 중성자선이 높은 관심을 받고 있다. 이미 국내에서도 원자력 연구소에 위치한 연구용 원자로인 "하나로"가 성공적으로 가동되어, 최근 설치 운영되고 있는 소각중성자산란 장치(small angle neutron scattering)등은 이미 활발히 사용되고 있다. 한편, 범국가적 차원에서 지원하고 있는 바이오기술(BT)에서 특히, 약물 전달 시스템, 생체유사고분자, 그리고 유사생체막등의 개발은 많은 국내 연구진들의 관심의 대상이 되고 있다. 특히, 특정한 조건에서 생체물질들의 구조 변화, 특정 부위에 흡착/탈착등의 변화등, 계면과 관련된 정보는 많은 관심을 끌고 있을 뿐 아니라, 실제로 그 연구의 성패를 가름하는 매우 필수적인 정보라 할 수 있다. 이와 관련해, 중성자 반사율 측정(neutron reflectivity)은 생체 물질의 계면의 구조, 그리고 단백질, DNA등과 생체막과의 상호작용등을 1nm 이하의 정밀하게 측정할 수 있어 최근 미국, 유럽등지에서는 BT연구의 핵심장비로 자리잡고 적극적으로 활용되어 지고

있다. 그동안 국내에서는 연구 장치가 전무한 관계로 생체기술과 관련되어서는 거의 알려지거나 사용된 바 없다. 그러나, 현재 한국 원자력연구소의 하나로 원자로에서는 중성자 반사율 측정장치를 개발 중에 있어, 국내에서도 많은 연구진들에서 본격적으로 시작하고 있는 극미세 연구 (NT)와 생체물질 연구 (BT)의 계면 측정에 있어 매우 중요한 장치로 활용될 것이 기대되고 있다. 본 학술발표대회에서는 이 중성자 반사율 장치의 소개와 함께, 현재 진행중인 단백질의 생체유사물질의 상호작용에 관련된 연구를 알리는 기회로 삼고자 한다. 본 초록의 일부는 한국 물리학회 물리학과 첨단기술 최신회와 2002년 미국 물리학회 초록집에 실린 내용을 일부 전제했음을 미리 밝힌다.³

왜 생체의 계면구조 측정에 중성자를 사용하는가?

생체막을 포함한 유기 박막의 연구에는 다음의 두 가지 이유로 중성자 반사율 측정장치 또한 매우 유용하게 쓰인다. 첫째는 중성자선의 투과력을 들 수 있다. 예를 들면 최근에 높아지고 있는 BT의 핵심 기술인 생체막, 혹은 유사 인공 생체막 (bio mimetic membrane)의 실험에는 이온을 동반한 인체내 유사 체액에 접촉하고 있을 때만이 그 측정 조건을 충족시킨다. 이때 대상 표면을 입사선에 노출시키고자 할 때, X-선의 경우는 액체로 된 완충 용액, 혹은 일반적인 생체막을 지탱하는 고체 기관(실리콘 또는 석영)을 투과할 때 발생하는 에너지의 손실이 너무 커서 측정하기 매우 어렵다. 그러나 중성자의 경우, 실리콘이나 석영을 포함하는 대부분의 단결정, 혹은 알루미늄과 같은 금속판인 경우도 80~90%의 투과율을 보인다. 이는 매질과 중성자의 상호작용이 물질의 밀도가 아닌 분자크기에 따른 중성자의 비에 비례하는 SLD에 관계하며 원자번호와는 전혀 무관하기 때문이다.⁴ 따라서, 다양한 매질과 접촉하고 있는 유기박막의 연구에 매우 유용하게 쓰일 수 있다. 실제로 물과 같은 액체 속에서의 유기 박막실험, 혹은 초임계상태의 액체상과 접하고 있는 박막, 혹은 고체와 고체사이에 갇힌 유기박막의 실험에 폭 넓게 사용되고 있다. 또 다른 대표적인 장점은, 중수소화(deuteration)를 통해 대상체의 contrast를 쉽게 조절할 수 있다는 점에 있다. X-선의 경우에는 유기체들의 전자밀도가 매우 유사하므로 C, H, O 만으로 이루어진 물질사이의 구분이 매우 어렵다.[9] 이에 비해 중성자의 경우는 화학적으로 매우 유사한 성질을 갖는 수소와 중수소를 치환시켜서 매우 높은 contrast를 부여할 수 있다.

중성자 반사율 측정의 기본 원리

입사된 파장은 다른 특성을 가진 두 물질이 만나는 계면을 지날 때, 그 계면에서 투과된 양을 제외한 일정량을 반사시키게 된다. 계면이나 표면이 이론적으로 완전한 평면이라고 하면, 반사 파장은 입사각과 동일각을 이루며 되돌아 나오게 된다. 이때 반사율(reflectivity)은 입사선과 반사선의 절대 강도의 비, 즉 최대치 1 (전반사)에서 0까지의 사이의 값을 가지며 중성자 반사율 측정장치의 경우 일반적으로 $1 \sim 10^{-6}$ 범위의 반사율 측정이 가능하다.

그럼 1에 정의된 것과 같이 z 를 표면에 수직인 방향으로 놓고, x 와 y 를 표면에 평행하게 놓을 때, 입사 파동 벡터 와 반사 파동 벡터 의 벡터전이(wavevector transfer)를 q 의 함수,

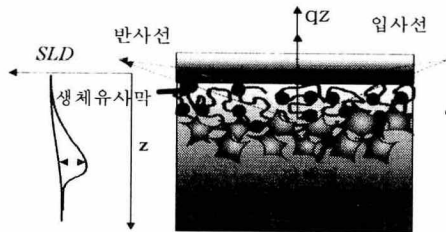


그림 1 그림 1. 생체유사 박막이 단백질등의 용액에 접촉하고 있는 경우, 계면에 흡착된 단백질의 구조를 측정하기 위해 Substrate에 입사된 파장의 파동벡터전이함수 q_z 의 정의.

값에 따른 반사율을 측정함으로써 박막의 두께(d)와 표면의 거칠기(roughness) 뿐 아니라, 계면에 접하고 있는 다른 물질의 양과 구조 변화를 포함하는 depth profiling등을 밝혀 낼 수 있다.

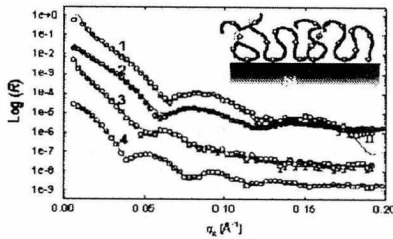


그림 2 그림 2. 12.8% Sulfonated Polystyrene(PSSA12.8%) 박막이 1) 공기 중, 2) 물, 3) 유기용매, 4) 물/유기용매의 혼합용액에 접촉할 때의 거울형 반사율. 비교를 위해서 각각 10-1씩 이동시켰음. 심볼로 나타난 점은 실제 측정값이고, 선은 모델에 의해 계산된 근사치를 나타낸다. 내부의 그림은 실리콘 기판에 흡착된 PSSA의 모델. (전제:물리학과 첨단기술 1/2, 29 (2002))

응성은 그 접촉하고 있는 계면에서 일어나기 때문에 직접 접촉하고 있는 상태에서의 연구가 필수적이다. 여기서 소개할 실험 결과의 하나는, 일반 플라스틱 용기의 기본 원료인 스티렌계 고분자에 이러한 이온결합을 첨가시킴으로써 다양한 액체와 반응성을 연구하고, 그 상호작용을 중성자 반사율 측정 실험을 통하여 밝힌 것이다.

그림 2는 전체 스티렌 단위분자의 12.8%를 술폰화 (sulfonation) 시켜서 SO_3-H^+ 의 치환기를 붙힌 고분자 (12.8% sulfonated polystyrene)를 약 10 nm 두께로 코팅한 박막을 다양한 액체에 접촉시킨 채로 중성자 반사율 측정 실험을 한 결과이다. 위에 첫 번째로 측정된 결과는 박막을 액체에 접촉시키기 전에 공기중에서 측정하였다. 쉽게 볼 수 있는 것과 같이

로 놓을 수 있다. 이때 α 와 α_i 의 값은 입사각 (α_i)과 반사각(α_r)의 변화에 의해서 조절될 수 있으므로, 이에 따른 운동량의 변화, q 의 함수로 그 변화량이 측정될 수 있다. 우리가 관심 있는 대칭 등각의 거울형 반사율은 α_i 와 α_r 를 등각으로 유지시키면서 변화시킬 때 변화하는 대상 물질 표면에 수직인 q 의 z 방향의 함수로 측정하게 되는 값이다. 이때 q 의 z 방향 성분은 $q_z = 2\pi/\lambda (\sin \alpha_i + \alpha_r)$ 으로 정의된다. 여기서 λ 는 사용되는 빛의 파장이다. 이와 같이 입사각과 반사각을 변화시키기에 따라 조절할 수 있는 q_z 의 변화

생체유사 박막의 구조 및 Fibronectin 흡착 실험 이온이 그 단위구조에 결합된 여러 자리 전해질 이온 공중합체(polyelectrolyte copolymer)는 생체 세포와 반응성, 그리고 박막 표면의 다른 이온물질과의 반응력으로, 생물학적인 인공 기능세포 개발이나, 생체 고분자들의 구조 연구, 그리고 전자제품의 필수 요소인 전지의 연구에 필수적인 대상으로 최근에 많은 연구가 진행되고 있다.⁵ 이러한 활용성은 모두 여러 자리 전해질 이온 공중합체의 박막을 여타의 용액(pH의 변화, 혹은 이온의 양)에 접촉시킴으로써 가져오는 성질이다. 따라서 기본연구의 대상으로 이러한 연구는 그 활용성에서 매우 가치가 높다고 할 수 있다. 대부분의 박막과 매질과의 반

9.5 % dPSSA

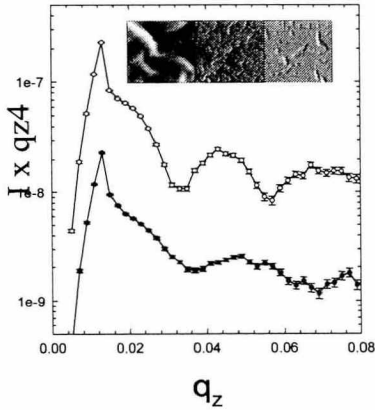


그림 3 중수소치환된 9.5%술폰화된 PS에 Fibronectin을 배양시키기 전(아래)와 240분동아 배양시킨후(위)의 중성자반사율실험. 삽입된 그림은 술폰화 정도별로 측정된 AFM사진.

qz 의 변화에 보여주는 단일 진동 주기(qz)는 박막의 두께에 비례하고, $d=2\pi/\Delta q$, 즉, ~ 10 nm에 근사한 값을 보여주며, 높은 qz 영역에서도 그 진동 파형이 유지됨은 박막의 표면의 거칠기가 낮음을 나타낸다. 두 번째 데이터는 같은 박막을 증류수에 접촉시켰을 때의 결과이다. 그 단일 진동주기가 미세하게 작아졌음을 알 수 있다. 이 의미는 물과는 반응성이 전혀 없는 스티렌 고분자가 첨가된 이온으로 인해 물분자와 반응을 일으켜, 물이 박막 내부로 흡수되어 두께가 미세하게 증가했음을 보여준다. 한편, 유전 상수가 매우 낮은 CCl_4 에 접촉한 경우에는 그 진동주기의 파장이 훨씬 작아졌고, 다시 말하면, 박막의 두께가 약 1.5 배 이상으로 증가함을 볼 수 있다. 이러한 실험들은 마지막 결과에서 보여주듯이 물과 CCl_4 를 함께 접촉시켜줄 때, 거칠기는 상대적으로 낮게 유지되면서도 그 두께는 더욱더 증가하는 결과를 보여주는 매우 흥미 있는 결과를 보여주고 있다.⁶

이러한 이온을 포함한 PSSx을 이용해, 생체구조 형성에 기본뼈대를 생성하는 인체의 단백질인 Fibronectin(Fn)을 체온으로 유지시키면서 중성자 반사장치를 통해 측정된 결과의 일부가 그림 3에 보여주고 있다. 중수소로 치환된 PSSx와 중수 버퍼 용액에서 측정한 결과, 아래의 데이터에서 보여주듯이, 매우 작은 진동만이 보여지고 있다. 약 240분이 지난 후, 다시 측정한 결과 진동주기는 미약하게 감소함과 동시에 파장의 높이는 훨씬 커졌음을 보여준다. 이는, 중수소 치환으로 contrast가 낮은 계면에, 낮은 SLD을 갖는 Fn이 흡착되었음을 보여준다. 이때 흡착된 두께는 약 2nm이었으며, PSSx의 내부로는 침투되지 못하고, 최 외각 계면에서만 흡착이 일어나고 있음을 알 수 있다. 발표회에서 그 구체적인 구조와 시간에 따른 변화에 관한 결과를 발표할 예정이다.

참고문헌

1. 본 초록의 일부는 2002년 미국 물리학회 March Meeting에 발표된바 있음.
2. Jian R. Lu *et al.*, Reduced protein Adsorption on the surface of a Chemically Grafted Phospholipid Monolayer, (2001) Langmuir, 17, 3382.
3. 신관우. 이정수, "중성자 반사율 측정장치" (2002), 물리학과 첨단기술, 1/2, 27.
4. J. Daillant *et al.*, "X-ray and Neutron Reflectivity" (1999), Springer.
5. K. Shin *et al.*, "Observation of Surface Ordering of Alkyl Side Chains in PS/Polyelectrolytes Diblock Copolymer Langmuir Films", (2001), 17, 4955.
6. K Shin *et al.*, "Langmuir 21, Structures of Thin Ionomer Films in Solvent Mixtures", 17, 6675.