

논문 20-1-14

근접장 마이크로파 현미경을 이용한 로돕신의 광학적 특성 연구

Optical Characterization of Sensory Rhodopsin II Thin Films using a Near-field Scanning Microwave Microscope

유경선¹, 김승희¹, 윤영운¹, 이기진^{1,a}, 이정하², 최아름², 정광환²
(Kyungson Yu¹, Songhui Kim¹, Youngwoon Yoon¹, Kiejin Lee^{1,a}, Jungha Lee², Ahreum Choi²,
and Kwang-Hwan Jung²)

Abstract

We report the electro-optical properties of the sensory rhodopsin II using a near-field scanning microwave microscope(NSMM). Rhodopsin was known as a photoreceptor pigment with a retinal as a chromophore via a protonated Schiff base and consists of seven α -helical transmembrane segments. The sensory rhodopsin II, expressing *E. coli* UT5600 with endogenous retinal biosynthesis system and purified with Ni²⁺-NTA affinity chromatography in the presence of 0.02 % DM (Dodecyl Maltoside) from *Natronomonas pharaonis*. We measured the absorption spectra and the transients difference of sensory rhodopsin II from *Natronomonas pharaonis* using a UV/VIS spectrophotometer with Nd-Yag Laser (532 nm). The absorption spectra of NpSR II showed a typical rhodopsin spectrum with a left shoulder region and the photointermediates spectra of NpSR II- ground state ($\lambda_{max}=498$ nm), NpSR II-M state ($\lambda_{max}=390$ nm), and NpSR II-O state ($\lambda_{max}=550$ nm) during the photocycle. The observed photocycle reaction was confirmed by measuring the microwave reflection coefficient S_{11} at an operating frequency of $f=3.93-3.95$ GHz and compared with the results of a photocycle of NpSR II.

Key Words : Sensory rhodopsin II, NSMM, Near-field scanning microwave microscope, *Natronomonas pharaonis*, NpSR II, Reflection coefficient, S_{11}

1. 서론

로돕신은 시홍이라고도 하며 동물의 망막에 존재하는 간상세포 내에 함유된 붉은색의 감광색소를 의미한다. 간상세포의 기능은 빛을 감지하고 물체의 명암을 구별하는데 있으며 로돕신이 중추적인 역할을 하고 있다[1]. 미생물의 광반응 단백질은 이온전송 역할을 하는 박테로로돕신(bacteriorhodopsin: BR), 할로로돕신(halorhodopsin: HR)과 광센서 역할을 하는 센서로돕신 I

(sensory rhodopsin : SR I), 센서로돕신 II (sensory rhodopsin II: SR II)로 구성되어 있다. BR과 HR은 각각 수소이온과 염소이온을 빛 에너지를 이용하여 운반하는 역할을 하며, SR I과 SR II는 단백질 막을 경유하여 세포의 운동기관에 각각 오렌지 빛과 파랑-녹색 빛의 신호를 보내는 주광성 수용체다[1-4]. 본 연구에 사용된 애집거미 센서로돕신 (*Natronomonas pharaonis* Sensory Rhodopsin II: NpSR II)은 고대 미라에서 발견된 고세균 *Natronomonas*로서 유전자를 클로닝하여, 대장균에서 발현하여 추출한 것으로 25 % 소금 용액 내에서 생존가능하고, 세포막 사이에 존재하는 7개의 특징적인 알파-나선구조를 가진 오렌지색 단백질로 알려져 있다[1,4]. 많은 연구의 결과 NpSR II는 열, 이온농도, pH, 세제 등에 매우 안정하다고 알려져 있다. NpSR II는 세포내에서 녹색

1. 서강대학교 물리학과 바이오통합협동과정 (서울시 마포구 신수1동)
2. 서강대학교 생명과학과 바이오통합협동과정
a. Corresponding Author : klee@sogang.ac.kr
접수일자 : 2006. 10. 16
1차 심사 : 2006. 11. 14
심사완료 : 2006. 12. 16

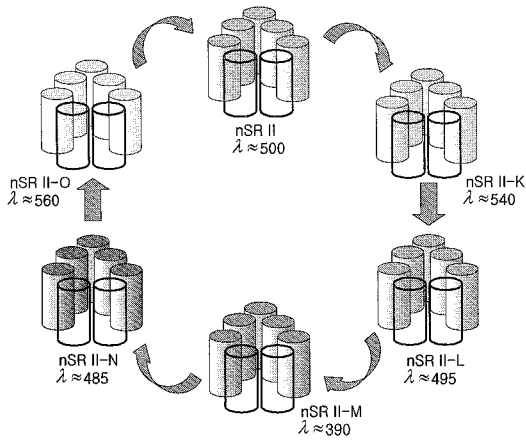


그림 1. NpSR II의 광순환 과정.
Fig. 1. Photocycle of NpSR II.

빛에 대한 신호를 세포 내부로 전달하고 편모의 회전 주기를 조절하여 주광성을 나타나게 하는 신호전달에 관여하는 막 단백질이다.

1.1 NpSR II의 광순환 특성

NpSR II는 빛 에너지를 받으면 광순환을 하게 되는데 다음과 같은 6가지 상태를 계속 순회하게 된다(NpSR II, -K, -L, -M, -N, -O)[4]. NpSR II는 세포막 안에 존재하며 500 nm의 최대 흡광도를 가진다. NpSR II가 에너지를 받으면 100 μ s 동안 NpSR II-M 상태로 바뀌게 된다. 이 상태는 390 nm의 최대흡수 스펙트럼을 가진다. 이 기저상태에서 NpSR II-O 상태를 거쳐 열적으로 붕괴하게 된다. 또한 100 ms 후에 NpSR II-O 상태에서는 560 nm 최대 흡수파장을 보이며, NpSR II-O 상태는 300 ms의 시간에 거쳐 NpSR II 기저상태로 돌아가게 된다. 만약 태양광과 같은 전과장 영역의 빛을 받았을 경우 이러한 사이클을 따라 계속 순회하게 된다. 이러한 광순환 과정을 그림 1에 나타내었다[1,4].

1.2 근접장 마이크로파 현미경

NpSR II의 전기-광학적 특성을 측정하기 위하여 근접장 마이크로파 현미경을 이용하였다. 마이크로파를 이용한 근접장 마이크로파 현미경 시스템은 다른 측정 장비에 비해 시스템의 구성이 간단하고 작동을 위한 조작이 쉽다. 또한, 탐침과 시료 사이의 일정거리를 유지할 수 있도록 튜닝 폭을 이용한 거리조절센서를 사용하므로 샘플 표면

에 대해 비접촉, 비파괴적 측정이 가능한 특성을 가지고 있다. 근접장 마이크로파 현미경 시스템의 또 다른 특징으로 샘플의 표면구조에 대한 연구뿐만 아니라 시료의 전자기적 특성에 대한 연구도 동시에 가능하다. 근접장 마이크로파 현미경 연구는 마이크로파의 반사계수를 측정해 도체, 반도체 및 유전체, 고체 시료뿐 아니라 완충용액 내에서 DNA, 단백질 등의 생물학적 샘플에 대한 전기적 특성연구도 가능하다[14-16]. 근접장 마이크로파 현미경은 공진기의 형태에 따라 동축선 공진기, 도파관 공진기, 유전체 공진기가 사용되고 있다[5-14]. 본 연구에서는 안정적이고 Q 인자가 높은 유전체 공진기를 사용한 근접장 마이크로파 현미경을 이용하여 특수한 파장 빛에 반응하는 NpSR II의 광순환 특성에 대해 마이크로파 반사계수(S_{11})를 측정하여 반응특성을 비교하였다.

마이크로파를 이용한 NpSR II의 반응특성을 측정하기 위한 실험장치로서 그림 3과 같이 근접장 마이크로파 현미경 시스템을 구성하였다. 그림 3에서 네트워크 에널라이저로부터 마이크로파가 유전체 공진기로 전달되고 공진기 내부에 위치한 유전체를 중심으로 전자계가 형성된다. 이러한 전자계는 공진기에 연결된 공진기 내부 커플링 루프에 의해 전계 및 자계의 특성에 따라 구분되어 측정에 사용된다. 공진기의 반응특성은 공진기 내부와 연결된 외부의 정밀 튜닝 연결나사를 이용하여 공진기의 공진주파수에서 Q 인자가 최대가 되도록 조절하였다. 공진기 내부의 마이크로파는 내부와 연결된 외부의 팁이 부착된 튜닝폭을 통해 팁 끝단으로 전달된다. 팁 근처에 시료가 위치하게 되면 팁 끝단의 쌍극자와 시료의 쌍극자가 서로 반응하게 되고 팁 끝단의 전계에는 변화가 일어나게 된다. 이러한 반응변화는 튜닝폭에 부착된 팁을 통해 공진기 내부로 전해지고 공진기 내부의 전자계에 변화를 일으켜 섭동을 유발한다[12,13]. 팁과 시료와의 상호작용에 따른 공진기 내부의 전자계 변화는 네트워크 에널라이저로 전달되어 마이크로파 반사계수의 형태로 나타내어진다. 근접장 마이크로파 현미경 시스템의 가장 큰 장점중의 하나는 측정과정에서 탐침이 시료표면에 대해 일정거리를 유지할 수 있기 때문에 비접촉 비파괴적 측정이 가능하다. 근접장 마이크로파 현미경 시스템에서 튜닝폭은 거리조절센서 역할을 한다. 튜닝폭에 교류전류를 인가하고 작동시켜 시료 표면에 접근시키면 튜닝폭과 시료표면 사이에는 강성힘(shear force)이 발생하게 된다. 강성힘은 시료 표면에 대해 평행한

방향으로 운동하는 튜닝폭에 작용하여 운동을 방해한다. 따라서 시료 표면에 접근할수록 강성힘의 영향은 커지고 튜닝폭의 진동진폭은 감소하게 된다. 이러한 반응 특성을 이용하여 근접장 마이크로파 현미경 시스템은 팁과 시료 사이의 일정 거리 조절을 유지한 상태에서 비접촉 측정이 가능하게 된다.

2. 실험 및 실험결과

NpSR II는 레티날을 합성하는 대장균 UT5600에서 발현, 분리, 및 정제되었다. NpSR II 유전자를 가진 플라즈미드를 대장균에 형질전환을 통하여 삽입하여 대장균을 키웠다. 1 mM IPTG와 0.02 % (+)-L-arabinose를 넣어 대량발현을 유도하여 30 °C, 200 rpm으로 24시간동안 진탕기에서 배양되었다. NpSR II가 발현된 세포들을 원심분리기를 통하여 모은 뒤, 첫 번째로 고주파음을 이용하여 세포를 파괴하고 초고속 원심분리기를 이용하여 세포에서 세포막을 분리하였다. 분리된 세포막에 1 % DM (n-Dodecyl-B-D-Maltopyranoside)를 처리하여 막 단백질질을 미소결정 상태로 유지시켰다. 카르복시 말단에 6개의 히스티딘이 붙어있는 NpSR II를 친화크로마토그래피 방법의 일종인 IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) 방법으로 Ni²⁺-NTA 수지 (Qiagen)를 이용하여 정제하였다. 용출시 사용된 250 mM 이미다졸을 제거하기 위하여 Amicon Ultra 튜브 농축기를 이용하였다. 측정버퍼 (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH7.0, 0.02 % DM)로 약 1/1000배로 희석한 후 다시 농축하여 흡수스펙트럼, 광주기 측정, 그리고 근접장 마이크로파를 이용한 측정에 사용하였다. NpSR II의 가시광 영역에서의 반응특성을 관측하기 위하여 80 %의 농도로 농축하여 실험에 적합하도록 한 후 광 흡수 장치 (Shimadzu UV-2450)를 이용하여 흡수도를 측정하였다. 그림 2에 측정된 NpSR II의 흡수스펙트럼을 나타내었다. 이는 파장대역에 따른 흡수정도를 나타낸 것으로 NpSR II는 특정 파장대역에서 반응 특성을 보였다. 그림 2의 흡수 스펙트럼에서 보이듯이 450-550 nm에서 흡수정도가 크게 측정되었고 498 nm에서 흡수가 가장 많이 된 것을 관측하였다. 또한, 460 nm 근처에서 분자에 의한 진동 특성 곡선이 관측되었다. 그림 2에서 420 nm 근처의 특성곡선은 세포막의 cytochrome C 단백질에 의한 특성곡선으로 생각된다.

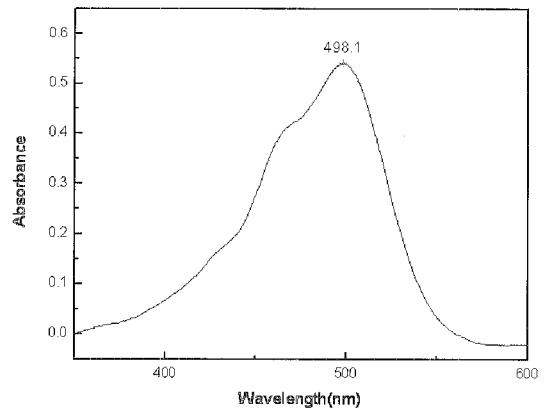


그림 2. NpSR II의 흡수 스펙트럼.

Fig. 2. Absorption spectrum of NpSR II.

그림 3의 근접장 마이크로파 현미경 시스템에서 네트워크 어날라이저 (Agilent E5071B)는 마이크로파를 유전체 공진기에 공급하는 동시에 마이크로파에 대한 NpSR II의 반응특성 신호를 받아 분석한다. 유전체 공진기는 내부의 반경이 17.5 mm이고, 높이가 20 mm인 원기둥 형태를 갖도록 제작되었다. 이때, 공진기의 내부는 손실을 줄이기 위하여 은도금으로 처리하였다. 공진기 내부의 정 중앙에는 직경이 13.65 mm이고, 높이가 6.2 mm인 원기둥 모양의 유전체가 위치하고 유전율이 29인 Ba(ZrTa)O₃로 이루어졌다. 공진기의 반응특성은 공진기 내부와 연결된 외부의 연결나사를 이용하여 공진기의 공진주파수에서 Q 인자가 최대가 되도록 조절하였다. 근접장 마이크로파 현미경 시스템에서는 거리조절센서로서 튜닝폭 (CFS308, [17])을 사용하였다. 거리조절센서로 사용되는 튜닝폭은 외부 캔 길이 8.2 mm, 직경 3.1 mm 및 입출력을 위한 2개의 다리를 갖고 있다. 거리조절센서를 만들기 위해 튜닝폭의 외부 캔을 벗겨내고 팁을 부착하였다[18]. 팁은 직경이 50 μm이고 스테인레스 스틸로 이루어졌다. 근접장 마이크로파 현미경 시스템은 거리조절장치를 통해, 팁이 시료표면에 최대한 근접했을 때 발생할 수 있는 문제점을 방지하도록 제작되었다. 이를 위해, 팁과 시료 사이의 일정거리를 유지하도록 록인암프와 피드백 시스템을 통해 팁과 시료 사이의 거리를 10 nm로 유지하였다. 측정과정에서 광원으로는 Xenon Arc Lamp (68911, 280 W)를 사용하였고 모노크로메터 (SDMC1-02)를 이용하여 분광된 광원을 일정 시간

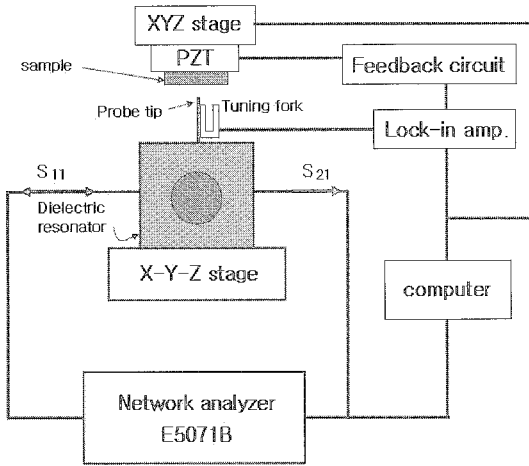


그림 3. 근접장 마이크로파 현미경 개요도.
Fig. 3. Schematic diagram of the NSMM.

간격으로 NpSR II에 비추었다. 그런 다음, 근접장 마이크로파 현미경 시스템으로 빛의 파장에 따른 반응특성에 대해 마이크로파 반사계수를 측정하였다.

빛의 파장에 따른 NpSR II의 광 반응특성을 측정하기 위한 전 과정으로 빛의 유무에 따른 NpSR II의 변화 및 반응특성을 근접장 마이크로파 현미경을 이용하여 측정하였다. 25 % NaCl 수용액에 함유된 순수한 NpSR II의 반응특성 측정에 앞서, 반응특성에 대조군으로 순수한 25 % NaCl 수용액을 만들어 측정하였다. 그런 다음, 밝은 환경과 어두운 환경에서 빛의 유무에 따른 NpSR II의 반응 정도를 측정하였다. 그 결과를 그림 4에 나타내었다. 25 % NaCl 수용액에 NpSR II가 함유된 경우 기준(25 % NaCl)보다 반사계수(S_{11})가 크게 측정되었다. 반사계수(S_{11})는 시료의 물리적 성질 특성에 따라 달라지며 이것의 측정결과는 시료의 유전율 변화에 따른 것이다. 이는 25 % NaCl 수용액의 유전율에 NpSR II의 유전율이 더해짐으로써 기준(25 % NaCl)보다 유전율이 증가하였고 반사계수의 증가를 가져왔다.

또한, 어두운 환경보다 밝은 환경에서 NpSR II의 반사계수(S_{11})가 크게 측정되었다. 이는 빛에 민감하게 반응하는 NpSR II 분자가 밝은 환경에서 여기되어 중간체 (NpSR II-O)를 만들며 어두운 환경보다 상대적으로 큰 반사계수 값이 측정됨을 알 수 있다. 이러한 NpSR II의 광순환 특성이 그림 5에 나타나 있다[3,4].

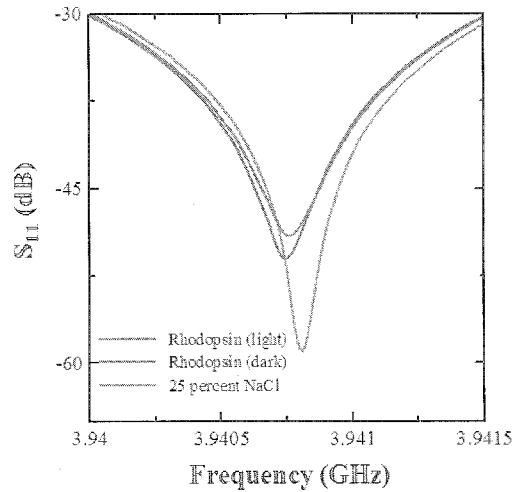


그림 4. 밝은 환경과 어두운 환경에서 NpSR II의 마이크로파 반사계수 (S_{11}).
Fig. 4. Microwave reflection-coefficient (S_{11}) of NpSR II in light and dark.

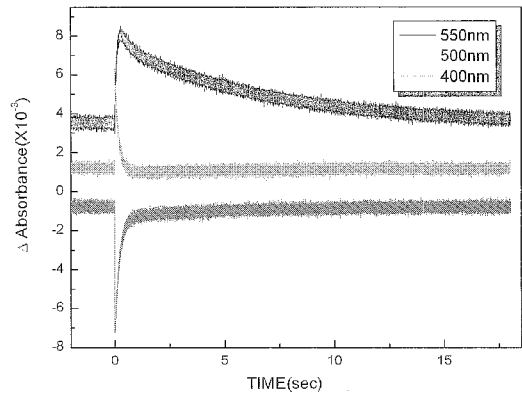


그림 5. NpSR II의 광순환 특성.
Fig. 5. Characteristic of photocycle in NpSR II.

그림 5에서 0.02 % DM에 녹아 있는 NpSR II의 광순환 특성이 초기상태인 NpSR II 상태 ($\lambda_{max}=500 \text{ nm}$)부터 시작하여 M ($\lambda_{max}=390 \text{ nm}$) 상태, O ($\lambda_{max}=550 \text{ nm}$) 상태의 사이클로 측정되었다. 이때, 에너지를 흡수하는 파장에서 peak이 나타나고 한 사이클이 끝나면 원래 상태인 NpSR II ($\lambda_{max}=500 \text{ nm}$) 상태로 되돌아가므로 500 nm 부분은 음의 특성 곡선으로 측정된다. 파장에 따른 NpSR II의 흡수정도에 따른 반응특성 측정에 근접장 마이크로파 현미경 시스템을 이용하였다. 따라

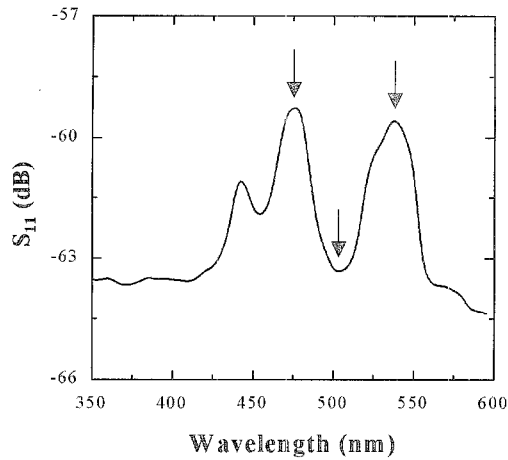


그림 6. 파장에 따른 NpSR II의 마이크로파 반사 계수 (S_{11}).

Fig. 6. Wavelength dependance of Microwave reflection-coefficient (S_{11}) in NpSR II.

서 NpSR II의 마이크로파에 대한 반응 특성을 알아보기 위해 파장대역에 따라 마이크로파 반사계수를 측정하였다. 그 결과를 그림 6에 나타내었다.

실험은 다른 상태로 에너지가 변환되는 것을 막고 반응정도를 정확히 측정하기 위하여 NpSR II가 충분히 암순응을 할 수 있는 시간 간격을 두고 측정하였다. 그림 6에서 보여 지듯이 NpSR II ($\lambda_{max}=500$ nm) 상태, NpSR II-O ($\lambda_{max}=540-550$ nm)상태의 반응특성이 측정되었다. 왜냐하면 M, O 중간체를 형성하는 각각의 $t_{1/2}$ 는 177 ms, 115 ms 이나 O 중간체가 사라지는 반감기는 4,157 ms 로 계속적인 빛을 쬐여 주면 O 중간체가 대량 만들어지게 되기 때문이다. 그러나 475 nm 근처의 특성곡선은 NpSR II-N ($\lambda_{max}=485$ nm) 상태이거나 아니면 이제까지의 방법으로 측정할 수 없었던 단백질 분자 내의 진동을 측정할 것일 수 있다. 지금까지의 내용을 종합해보면 특별한 파장의 빛을 받으면 NpSR II의 레티날 및 단백질의 구조변화가 일어나며 마이크로파 반사계수를 측정한 결과의 반응정도와 비교한 결과 광순환 특성과 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

3. 결론

본 연구에서는 애집거미 센서리로돕신에서 추출한 NpSR II의 전기-광학적 특성을 연구 관측하였

다. 가시광선 영역에서 흡수도를 측정한 결과 450-550 nm에서 흡수정도가 크게 측정되었고, 498 nm에서 흡수가 가장 많이 이루어진 것으로 측정되었다. 튜닝폭 거리조절 센서를 이용하여 거리 조절이 가능한 근접장 마이크로파 현미경을 제작하였다. 이를 이용하여, 생물학적 시료인 NpSR II 막 단백질에 대해 비접촉, 비파괴적으로 빛의 파장에 따른 반응특성을 마이크로파 반사계수(S_{11})로 측정하여 알아보았다. NpSR II에 대해 동일 파장대역에서 흡수도를 통해 얻은 광순환 반응특성과 마이크로파에 대한 반응 특성결과를 비교하였다. 그 결과, 두 부분에서 기존의 흡수도를 통한 광순환 특성과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 즉, NpSR II ($\lambda_{max}=500$ nm) 상태, NpSR II-O ($\lambda_{max}=540-550$ nm) 상태의 반응특성이 근접장 마이크로파 현미경 시스템으로 측정되었다. 이러한 결과로부터 로돕신 처럼 빛에 반응특성을 보이는 시료에도 근접장 마이크로파 현미경의 응용 연구가 가능함을 확인하였다. 근접장 마이크로파 현미경을 이용한 연구는 시료에 대해 비접촉, 비파괴적 측정을 보장하므로 로돕신과 같은 생물학적 성질을 갖는 생체시료의 특성 연구에 더 적합하다. 더불어 근접장 마이크로파 현미경 시스템은 빛의 유무에 따른 시료의 마이크로파 반응특성에 대해 3차원 영상도 가능하게 한다. 따라서 빛에 대한 로돕신의 반응특성이 갖는 전자기적 변화에 대해 근접장 마이크로파 이미지를 얻는다면 전자기적 변화과정에 대한 확인이 가능할 것으로 기대한다.

감사의 글

This work was supported by Sogang University(2006), by the Korea Research Foundation (KRF-2005-042-C00058; KRF-2002-005-CS0003), Seoul Research and Business Development Program(10816) and by the Korea Science & Engineering Foundation (F01-2004-000-1082-0; R01-2006-000-11227-0; F01-2005-000-10096-0).

참고 문헌

- [1] J. L. Spudich, C. S. Yang, K. H. Jung, and E. N. Spudich, "Retinylidene proteins: Structures and functions from Archaea to humans", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Vol. 16, p. 365, 2002.

- [2] J. L. Spudich and K. H. Jung, "Microbial rhodopsins: Phylogenetic and functional diversity", eds Briggs, WR and Spudich JL, Handbook of Photosensory Receptors. Wiley-VCH Press, Weinheim, Germany, p. 1, 2005.
- [3] E. R. S. Kunji, E. N. Spudich, R. Grisshammer, R. Henderson, and J. L. Spudich, "Electron crystallographic analysis of two-dimensional crystals of sensory rhodopsin II: A 6.9 Å projection structure", J. Mol. Biol., Vol. 308, p. 279, 2001.
- [4] J. Sasaki and J. L. Spudich, "Proton transport by sensory rhodopsins and its modulation by transducer-binding", Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1460, p. 230, 2000.
- [5] C. H. Sikorsi and U. Merkt, "Spectroscopy of electronic states in InSb quantum dots", Phys. Rev Lett., Vol. 62, p. 2164, 1989.
- [6] C. Gao and X.-D. Xiang, "Quantitative microwave near-field microscopy of dielectric properties", Rev. Sci. Instrum., Vol. 69 p. 3846, 1998.
- [7] E. Hecht, "Optics", Addison-Wesley, 1987.
- [8] J. Kim, M. Kim, H. Kim, D. Song, K. Lee, and B. Friedman, "The study of near-field scanning microwave microscope for the nondestructive detection system", Appl. Phys. Letts., Vol. 83, p. 1026, 2003.
- [9] D. Kajfez and P. Guillon, "Dielectric resonators", Noble publishing Co., Atlanta, 1998.
- [10] Gabriel M. Rebeiz, "RF MEMS theory, design, and technology", Wiley-Interscience, 2003.
- [11] J. Kim, M. Kim, H. Kim, D. Song, B. Friedman, and K. Lee, "Improving images form a near-field scanning microwave microscope using a hybrid probe", Appl. Phys. Lett., Vol. 83, p. 1026 2003.
- [12] J. Kim, S. Kim, H. Yoo, J. Yang, H. Yoo, K. Yu, S. Kim, and K. Lee, "The study of near-field scanning microwave microscope for the nondestructive detection system", Journal of the Korean Society for Nondestructive Testing, Vol. 24, No. 5, 2004.
- [13] H. Goldstein "Classical mechanics", Addison-Wesley, 1986.
- [14] S. Kim, H. Yoo, K. Lee, and B. Friedman, "Distance control for a near-field scanning microwave microscope in liquid using a quartz tuning fork", Appl. Phys. Letts., Vol. 86, p. 153506, 2005.
- [15] M. Koopman, B. I. de Bakker, M. F. Garcia-Parajo, and N. F. van Hulst, "Shear force imaging of soft samples in liquid using a diving bell concept", Appl. Phys. Lett., Vol. 83, No. 24, p. 5083, 2003.
- [16] W. H. J. Rensen, N. F. van Hulst, and S. B. Kmmmer, "Imaging soft samples in liquid with tuning fork based shear force microscopy", Appl. Phys. Lett., Vol. 77, p. 1557, 2000.
- [17] <http://www.citizen.co.jp/english/crystal/index.html>
- [18] K. Karrai and R. D. Grober, "Piezoelectric tip-sample distance control for near field optical microscopes", Appl. Phys. Lett., Vol. 66, p. 1842, 1995.