

# 시간분해 X-선 회절을 이용한 분자 구조 동역학 연구

이효철 (KAIST 화학과)

## 1. 서문

화학 반응에서 대상이 되는 분자의 구조는 많은 화학적/생물적 현상과 그 기능에 상당히 중요한 의미를 가진다. 또한 화학 평형에 도달하기 전 상당히 짧은 시간에 일어나는 분자 반응에 대한 이해는 많은 화학 반응의 이해와 조절에 필수적이라 할 수 있다. 따라서 원자 수준의 공간 분해능과 충분한 시간 분해능을 가진 실시간 분석 도구는 상당히 중요한 역할을 한다. 하지만 현재까지의 나노 및 바이오 기술에 대한 대부분의 연구가 나노 수준의 입자나 디바이스의 합성과 그것들의 정적인 특성 규명에만 치중되었음이 또한 사실이다. 다시 말하면 그 공간 분해능은 TEM, SEM이나 STM, 혹은 광학 현미경 등으로 충분히 만족할 만 했지만, 그 공간 분해능과 함께 화학 반응에 대해서 밀해줄 시간 분해능을 함께 가진 기술은 전무했다 해도 과언이 아닐 것이다. 이런 관점에서 실시간 회절 기술(Real-time diffraction technology)이 주목할 만한 대안으로 떠올랐고 현재 미국을 비롯한 여러 선진국에서 이 기술의 개발과 성능 향상에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다 [1-12].

레이저의 발달과 함께 등장한 시간분해 레이저 분광법 (time-resolved laser spectroscopy)은 극초단의 시간 분해능 (<100 fs)을 가지고 많은 화학 반응에서 일어나는 중간체를 관찰하고 반응 메커니즘을 규명하는데 많은 정보를 주었다 [13,14]. 하지만 분광법 자체는 분자의 에너지 준위 사이의 전이 현상에 기초한 것이므로, 에너지 준위에 대한 사전 정보가 없거나 매우 복잡한 경우엔, 분광법을 이용

한 연구에서 직접적이고도 통합적인 3차원적 구조 정보를 끌어내는 것은 무리가 있다. 특히 대상 분자 시스템이 커질수록 이 문제는 더욱 심각해진다. 대부분의 단백질의 3차원 구조는 분광법이 아니라 X-선 결정법(X-ray Crystallography)으로 얻어지는 것을 생각하면 쉽게 이해될 것이다. “보는 것이 믿는 것이다”라는 옛 격언처럼 화학에서 실시간으로 변하는 분자의 구조를 직접적으로 연구하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다. 이런 관점에서 지난 몇 년 동안 비약적으로 발전해온, 하지만 아직은 그 개발 초기인 시간분해 회절법(time-resolved diffraction)은 전 세계적으로 많은 주목을 받고 있다. 그림 1은 실시간 회절 기술의 개요를 나타낸다. 연구하고자 하는 분자 시스템에 외부로부터 온도나 레이저 같은 시작 신호로 화학 반응을 시작시키면 그 안에서는 여러 가지 구조 변화가 나타난다. 이 변화의 시간대는 빠르게는 펨토초에서 느린 것은 피코초, 나노초, 더 나아가서 밀리초가 걸리는데 이러한 구조 변화를 직접적으로 알아내기 위해서 회절에 사용할 수 있는 펄스, 즉 극초단 전자 및 X-선 펄스를 반응이 일어나고 있는 분자 시스템에 보내어 그 회절 신호를 잡아내게 된다. 반응을 시킬 때 사용한 레이저 펄스와 이 회절 펄스 사이의 시간차를 바꾸어 주면서 회절 신호를 얻게 되면 그 회절 신호는 각 시점에서의 구조에 대한 직접적인 정보를 담게 되는 것이다. 전자나 X-선 펄스는 분자 내 모든 원자에 의해 회절 현상을 나타내기 때문에 이 기술을 사용하면 화학 반응에서 변하는 3차원적인 구조 정보를 기록할 수 있다. 이 글에서는

저자의 실험실에서 최근에 이루어진 연구결과를 [1,2] 중심으로 이 기술에 대한 간략한 소개를 하고자 하며 비슷한 내용이 대한화학회 월간화학세계의 우수연구실 소개섹션에도 기고 되었음을 밝혀 둔다.

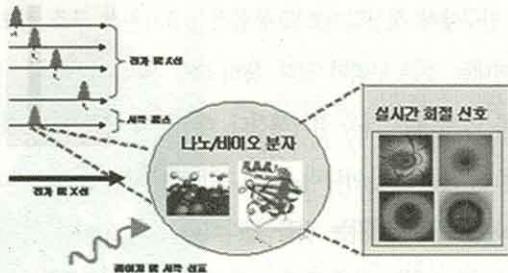


그림 1. 시간 분해 회절법의 개요

## 2. 시간분해 X-선 회절과 그 응용

회절에 사용될 수 있는 극초단 펄스에는 X-선 펄스와 전자 펄스가 있다. 각 펄스의 특성에 따라 시간 분해 회절법이 적용될 수 있는 분자 시스템에 많은 차이가 있다. 전자는 X-선 보다  $10^6$  배 이상 강한 원자에 의한 산란효과를 보이기 때문에 기체 상태, 얇은 막, 그리고 표면 등과 같은 대상에 잘 적용될 수 있다. 반면 X-선은 강한 침투 효과로 인하여 액체 상태나 결정 등과 같은 두꺼운 분자 시스템에 주로 이용될 수 있다.

현재까지 개발된 얇은 시간 폭을 가진 X-선을 만들어 내는 방법에는 제 3세대 입자가속기로부터 생성되는 X-선, 레이저 플라즈마 효과를 이용하는 방법, 그리고 원자나 분자에서는 고차조화파를 이용한 X-선 등이 있다. 이러한 방법 중에 회절에 적당한 광자 세기와 에너지를 가진 X-선을 얻는 방법에는 제 3세대 입자가속기를 이용하는 방법이 유일하다. 현재 포항가속기에는 시간분해 X-선 회절 실험이 가능한 빔라인이 없다. 이 실험이 가능한 빔라인은 프랑스

그레노블에 있는 ESRF의 ID09B와, 미국 아르곤의 APS에 있는 14IDB이다.

### 2.1 용액 상태의 시간 분해 X-선 회절법

용액 중의 원자의 움직임을 실시간으로 관찰하거나 중간 체에 대한 직접적인 구조 정보를 얻는 것은 지금까지 거의 불가능하게 여겨왔다. 용액상에서는 우리가 관심 있는 용질 분자 외에 수 많은 용매 분자가 존재하여 용질-용매 복합체를 형성하게 된다. 그림2는 용액 상태의 구조 동역학을 연구하는 데 사용되는 시간 분해 X-선 회절법의 실험 장치의 개요를 나타낸다.

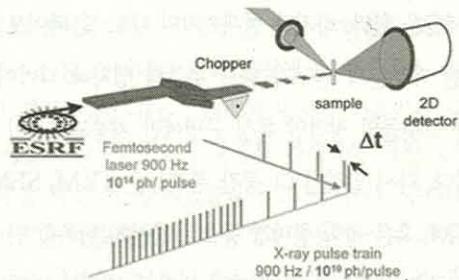


그림 2. 시간 분해 액체 X-선 회절법의 실험 장치

앞서 기술된 것처럼 들품-탐색(pump-probe) 방법을 사용하는데, 펨토초 레이저를 이용, 용액의 용질 입자에 원하는 반응을 시작시키고 입자가속기의 특수 작동 모드에서 얻어지는 X-선 펄스를 일정한 시간 뒤에 조사 시켜 원하는 회절 패턴을 얻는다. 레이저를 조사 시키지 않는 회절 패턴을 특정한 시간에서의 회절 패턴에 빼게 되면 그 시간에서의 구조 정보를 직접적으로 담고 있는 회절 패턴을 얻을 수 있다. 이 실험은 매우 높은 정밀도와 정확성을 요구하는데 우리가 원하는 용질 분자의 회절 신호가 수 많은 용매 분자에 의한 회절 신호에 묻혀버리기 때문이다. 본 연구실은 이 방법을 1,2-diiodoethane( $C_2H_4I_2$ ) 분자의 광분해에 적

용하였다 [2]. 그림 3A에서는 실제로 얻어진 시간분해 회절 패턴을 몇몇 시간에 대해 보여주고 있다. 이러한 2차원적 회절패턴은 대체적으로 대칭적이므로 같은 회절각에 해당하는 신호를 평균하면 그림 3B와 같은 1차원적인 시간 분해 회절 신호를 산란벡터에 대한 함수로 얻어내게 된다. 이 신호들은 reciprocal space에 해당하는 정보를 담고 있는데 이들을 푸리에 변환(Fourier transform)하면 그림 3C와 같은 실제공간(real space) 상에서의 정보로 변환이 가능하다. 얻어진 회절 신호를 이론적으로 분석하기 위해서는 용질 분자의 구조 변화에 의한 회절 신호, 용질-용매 분자의 상호 작용 변화에 의한 회절 신호, 그리고 마지막으로 용질 분자의 여기로 인한 에너지 전달에 의한 용매 분자 자체의 열적 팽창에 의한 회절 신호를 모두 고려하여야 한다. 이를 위해서 DFT(density-functional theory) 계산과 Molecular Dynamic(MD) 시뮬레이션을 수행하고 용질 분자의 구조 변화로부터 얻어지는 에너지를 용매의 hydrodynamics와 연관시켜 분석하였다. 그 결과 유기 화학에서 입체 반응 선택성을 설명하는데 매우 중요한 역할을 하는 삼원자 링 구조의 중간체를 직접적으로 관찰하는데 처음으로 성공하였으며 일련의 일어나는 반응에 대한 구조를 정확하게 관찰하였다 [2] (그림 4).

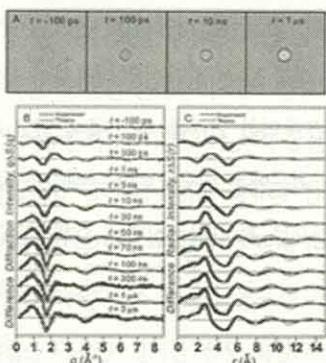


그림3.  $\text{C}_2\text{H}_4\text{I}_2$  분자에 대한 실시간 X-선 회절 패턴 및 데이터와 이론과의 비교.

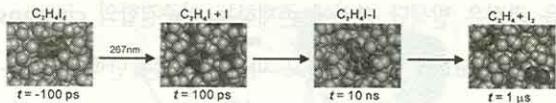


그림4.  $\text{C}_2\text{H}_4\text{I}_2$  분자의 중간체와 구조 동역학의 나타내는 모식도

## 2.2 시간분해 라우에 회절법

용액 상태에서 일어나는 작은 분자들의 반응 메커니즘 연구 뿐 아니라 단백질의 작용과정에서 일어나는 직접적이고 실시간적인 구조정보를 얻기 위해서는 시간분해 라우에 X-선 결정학을 이용하여 연구를 수행하고 있다. 이 방법은 실험장치나 방법은 액체 상태의 시간 분해 X-선 회절법과 거의 같지만 액체 시료 대신에 좋은 회절 패턴을 보이는 단백질 단결정을 쓴다는 것이 다른 점이다. 액체와는 달리 단결정에는 장거리 규칙성이 존재하므로 그림 5에서처럼 격자구조에 기인한 회절점(diffraction spot)들을 볼 수 있다.

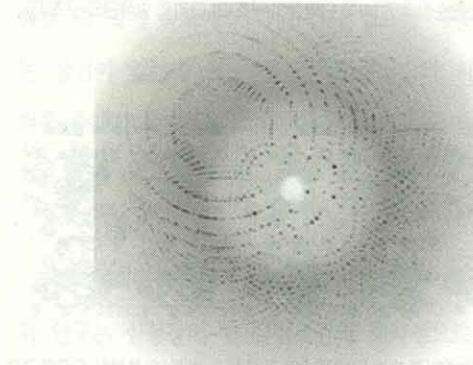


그림5. 시간분해 라우에 회절 패턴의 예

시간분해 라우에 회절법을 사용한 대표적인 연구의 예로서 광흡수 단백질인 Photoactive Yellow Protein(PYP)를 들 수 있다 [1]. PYP는 *H. Halophila*라는 박테리아의 주광성(phototaxis) 현상에 관여하는 전체적인 신호 전달의 시작점으로 알려져 있다. PYP는 푸른색 영역의 빛을 흡수하여 그림 6에 나타낸 광순환 과정을 거치게 되는데 처

음 과정은 발색단 분자에 존재하는 이중결합의 cis-trans isomerization 이 일어나고 마지막으로는 단백질의 N-terminal 부근에 전자밀도의 변화와 함께 신호전달이 일어나게 된다. 본 연구실에서는 1나노초에서 1초 사이의 시간 영역내에서 47개의 시간 포인트들에 대해 시간 분해 라우에 회절법을 이용하여 PYP에서 일어나는 신호전달 메커니즘을 밝혀내고 아직까지 밝혀지지 않은 발색단의 중간체 구조들과 그 동역학을 SVD(singular value decomposition) 방법을 이용하여 최초로 제안하였다 [1] (그림 7).

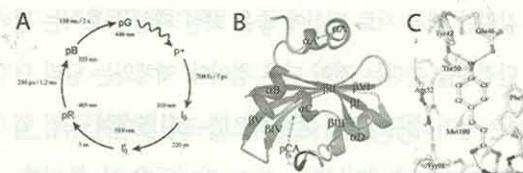


그림6. PYP의 광순환 과정(A)과 단백질의 구조(B) 그리고 발색단의 구조(C)

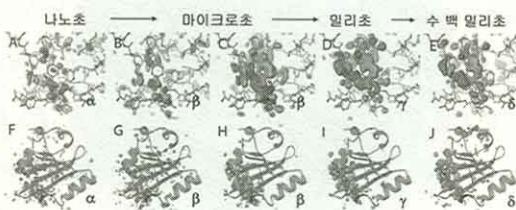


그림 7. 시간대에 따른 PYP 단백질내의 전자 밀도 변화. 왼쪽부터 오른쪽으로 갈수록 시간이 길어진다. 아랫쪽은 전체 단백질을 보여주고 윗쪽은 흡광단 주위를 상세하게 보여준다. 수백 밀리초에서는 N-터미널 쪽에 신호가 나타난다.

그림 7에서 보는 바와 같이 시간이 진행됨에 따라 구조 변화가 흡광단에서 출발하여 어떻게 변하는지를 상세하게 실험적으로 알 수 있다. 흡광단 부분의 구조변화를 좀 더 자세하게 연구하면 그림 8에 나타낸 다소 복잡한 반응경로가 존재함을 알 수 있었다 [1].

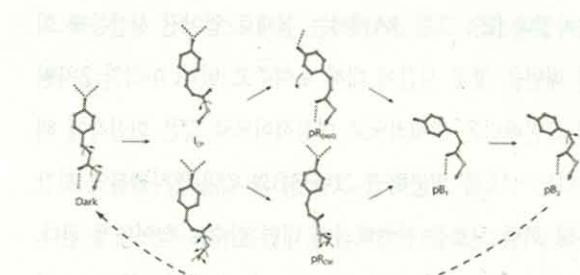


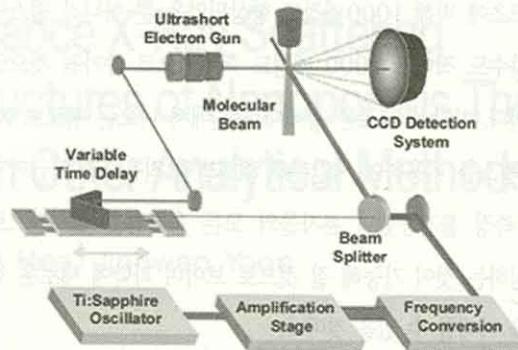
그림 8. PYP흡광단의 구조동력학적 메커니즘

### 2.1.3. 용액 중의 단백질 분자의 구조 동역학 연구

위에서 언급한 시간 분해 라우에 결정학은 좋은 회절 패턴을 만들어 내기 위해서 단백질 단결정이 필요하다는 단점이 있다. 또한 실제 단백질이 작용하고 반응하는 용액 내에서는 구조변화를 정확히 묘사할 수 있는가 하는 의문이 남는다. 따라서 용액중의 단백질 구조 분석과 변화를 관찰할 수 있는 방법이 요구되는데 이러한 목적에 대해 소각 X-선 산란법(small-angle X-ray scattering)이 주로 사용된다. 그 동안 소각 X-선 산란법을 사용하여 단백질 전체의 모양이나 구조에 대한 정보는 얻을 수 있었지만 들뜸-탐색의 시간분해 X-선 산란법을 사용한 용액상태에서의 단백질에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았기 때문에 연구 결과가 거의 전무한 상태이다. 이에 현재 본 연구실에서는 시간 분해 소각 및 대각 X-선 산란법을 이용하여 용액중의 단백질 분자의 구조동역학 연구를 수행 중에 있고 좋은 데이터를 얻고 있다. 최근에는 혈액글로빈 단백질의 4차원적 구조 변화를 실시간으로 쟁여내는 실험을 수행하였고 현재 분석 중에 있다.

### 3. 시간분해 전자회절법

지금까지는 제3세대 가속기에서 제공되는 100피코초 대의 X-선 펄스를 사용한 시간분해 X-선 회절법에 대한 연구를 소개하였다. 앞서도 잠깐 언급한 것처럼 시간분해 회절에는 X-선 뿐 아니라 전자를 사용할 수 있는데 전자회절 장치는 가속기보다 훨씬 작은 공간, 즉 보통의 실험실정도의 공간만을 차지하는 장점이 있다. 이에 대한 개략적인 실험장치를 그림 8에 나타내었다. 현재 실시간 전자 회절 기술에서 가장 많이 쓰이는 펨토초 광원 레이저는 안정된 출력을 보이는 증폭된 모드-락 타이타늄 사파이어 레이저이다. 발진된 펨토초 레이저 펄스는 무기물질 비선형 광학결정에 의해 가시광선 또는 자외선 영역대로 파장이 가변되고 둘로 갈라진다. 하나는 시료에 조사되어 원하는 분자 시스템에 반응을 시작시키고 다른 하나는 일정한 시간 뒤에 전자총 내의 광음극판에 조사되어 짧은 시간 폭을 가지는 전자펄스를 생성시킨다. 생성된 전자펄스는 DC가속 전압과 마그네틱 렌즈에 의해 가속되고 집진 되고, 반응이 시작된 후 일정한 시간 간격 후에 시료에 조사되어 회절패턴을 형성하고 CCD 카메라와 같은 검출기에 영상으로 저장된다. 따라서 시작 레이저 펄스와 전자 펄스 사이의 시간차이를 변화시켜가며 영상을 얻으면 원하는 분자 시스템의 시간 분해 정보를 얻을 수 있다. 시간 분해 전자 회절 장치는 최근 십여년 동안 안정성, 감도와 시간 및 공간 분해능이 크게 향상되어 현재는 약 수 피코초의 시간분해능과 약  $0.01\text{ \AA}$ 의 공간분해능을 가지고 기체 상태에서 일어나는 여러 종류의 반응들의 시간에 따른 구조변화를 관찰할 수 있다 [5]. 현재 본 연구실에서는 기체 및 박막 상태의 구조 동역학 연구가 가능한 60 keV의 가속 전압을 이용한 실시간 전자 회절 기술을 확립하여 현재 그 실험 장치 구현 중에 있다.



[그림 6] 시간 분해 전자 회절법의 실험장치 개략도

위에서 설명한 전자펄스발생장치는 DC전자총이다. 지금까지의 극초단 전자펄스는 주로 DC 전자총에서 만들어졌지만 최근에는 RF 전자총에서 만들어진 전자펄스가 사용될 수 있음이 제안되었고 현재 포항가속기와의 공동연구로 진행중이다. DC 전자총에 비해 RF 전자총은 훨씬 더 빠른, 즉 빛에 속도에 가까운 전자 펄스를 제공할 수 있다는 장점이 있는데 이는 곧 전자회절실험의 시간분해능이 더욱 좋아진다는 것을 의미한다.

### 4. 전망

다양한 화학반응에서 생성되는 중간체에 대한 구조 동역학 연구는 실험장비 및 실험조건의 제약성으로 인해 실험이 까다롭고 결과를 해석하는데 있어서 복잡함으로 인해 심층적인 연구를 수행하고 있는 연구실은 세계적으로 소수의 그룹에 불과하다. 특히 국내에서는 본 연구실 이외에는 거의 같은 분야의 연구가 없는 실정이다. 하지만 곧 수년 내에는 X-선 자유전자레이저 (XFEL)의 출현으로 수십에서 수백 펨토초 대의 극초단 X-선 펄스의 사용이 가능할 것으로 보인다. 현재 우리나라에서도 XFEL 건설이 논의되고 있다. 이 극초단 X-선 펄스는 시간분해능이 기존의 수백

피코초에 비해 1000배정도 향상되었을 뿐 아니라 펄스당 광자수도 적어도 1000 배정도 획기적으로 증가될 것으로 보인다. 따라서 새로운 차세대 광원에서 나오는 펨토초 X-선 펄스를 이용하여 시간분해 회절법에 적용하면 지금까지는 측정 불가능했던 분자들의 모든 움직임을 실시간으로 측정하는 것이 가능해 질 것으로 보이며 과학에 새로운 혁명을 기대할 수 있을 것이다.

## 5. 참고문헌

- Ihee, H. et al. Visualizing Reaction Pathway in Photoactive Yellow Protein from Nanoseconds to Seconds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7145-7150 (2005).
- Ihee, H. et al. Ultrafast X-ray diffraction of transient molecular structures in solution. *Science* 309, 1223-1227 (2005).
- Ruan, C.-Y., Lobastov, V. A., Vigliotti, F., Chen, S. & Zewail, A. H. Ultrafast Electron Crystallography of Interfacial Water. *Science* 304, 80-84 (2004).
- Siwick, B. J., Dwyer, J. R., Jordan, R. E. & Miller, R. J. D. An Atomic-Level View of Melting Using Femtosecond Electron Diffraction. *Science* 302, 1382-1385 (2003).
- Ihee, H. et al. Direct Imaging of Transient Molecular Structures with Ultrafast Diffraction. *Science* 291, 458-462 (2001).
- Dudek, R. C. & Weber, P. M. Ultrafast diffraction imaging of the electrocyclic ring-opening reaction of 1,3-cyclohexadiene. *J. Phys. Chem. A* 105, 4167-4171 (2001).
- Rischel, C. et al. Femtosecond time-resolved X-ray diffraction from laser-heated organic films. *Nature* 390, 490-492 (1997).
- Schotte, F. et al. Watching a protein as it functions with 150ps time-resolved X-ray crystallography. *Science* 300, 1944-1947 (2003).
- Tomov, I. V., Qulianov, D. A., Chen, P. & Rentzepis, P. M. Ultrafast Time-Resolved Transient Structures of Solids and Liquids Studied by Means of X-ray Diffraction and EXAFS. *J. Phys. Chem. B* 103, 7081-7091 (1999).
- Rose-Petrucci, C. et al. Picosecond-milliangstrom lattice dynamics measured by ultrafast X-ray diffraction. *Nature* 398, 310-312 (1999).
- Siders, C. W. et al. Detection of nonthermal melting by ultrafast X-ray diffraction. *Science* 286, 1340-1342 (1999).
- Bratos, S., Mirloup, F., Vuilleumier, R., Wulff, M. & Plech, A. X-ray Filming of atomic motions in chemical reactions. *Chem. Phys.* 304, 245-251 (2004).
- Zewail, A. H. Femtochemistry: Ultrafast Dynamics of the Chemical Bond (World Scientific, Singapore, 1994).
- Zewail, A. H. Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond. *J. Phys. Chem. A* 104, 5660-5694 (2000).

### 〈저자약력〉

“이효철 교수는 2001년 5월에 Caltech화학과에서 박사학위를 받고, 2003년 7월까지 시카고 대학교 분자생물학 및 생화학과에서 박사후 연구원 활동을 거친 후 현재는 KAIST 화학과에서 재직중이십니다.”