

$\alpha_1(\text{I})$ 및 $\alpha_2(\text{I})$ 사슬 콜라겐의 질량분석법 개발 연구

김광연¹ · 조선영¹ · 이상한² · 남해선³ · 김성호^{1*}

Development of mass spectrometric analysis of $\alpha_1(\text{I})$ and $\alpha_2(\text{I})$ chain Collagen

Kwang-Yon Kim¹, Seon-Young Cho¹, Sang-Han Lee²,
Hae-Seon Nam³ and Sung-Ho Kim^{1*}

요 약 포유동물에서 중요한 구조단백질인 콜라겐은 다양한 조직내 단백질 조성과 사슬간 복잡한 가교결합의 존재로 인해 그 구조가 복잡하고 다양하여, 직접적으로 분석할 적당한 방법이 없었다. 본 연구에서는 간단한 전처리만으로 다수의 생체분자 시료에 대해 정확한 분자량 측정이 가능한 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량분석법(MALDI-TOF MS)을 이용하여 콜라겐과 조각화된 콜라겐을 분석하고 이의 아미노산 서열을 사중극자-비행시간 직렬 질량분석법(Q-TOF MS/MS)으로 확인하여, 시료 중의 콜라겐의 종류에 대한 정보를 확인하여, MALDI-TOF 질량분석을 이용한 콜라겐 분석에서 콜라겐의 종류를 쉽게 예측할 수 있는 방법을 제시하고자 하였다. 쥐의 꼬리에서 분리한 콜라겐을 SDS-PAGE로 분리한 결과 10개의 band를 얻을 수 있었는데, 같은 시료를 MALDI-TOF MS로 확인하여 각 band의 정확한 분자량을 결정할 수 있었다. SDS-PAGE상의 10개의 분리된 band에 대해 각각 tryptic digestion 후 MALDI-TOF 질량분석을 수행한 결과 4개의 band에서 type I 콜라겐의 α_1 -chain 내의 fragment인 Gly1056-Arg1073을 확인할 수 있었고, 5개의 band에서 type I 콜라겐의 α_2 -chain 내의 fragment인 Gly985-Arg1002을 확인하였다. 잔재한 콜라겐의 가교결합으로 인해 예상되는 fragment 중 둘만이 확인되었지만, 확인된 fragment를 통해 적어도 7개의 band에서는 type I 콜라겐이 존재함을 확인할 수 있었다. 확인된 두 콜라겐 fragment의 아미노산 서열을 Q-TOF MS/MS로 분석한 결과 MALDI-TOF MS에서의 예측과 일치함을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 확인된 두 fragment에 의한 peak을 지문으로 하여 MALDI-TOF MS 측정시에 시료내의 type I 콜라겐의 존재를 쉽게 확인할 수 있음을 볼 수 있었다.

Abstract Collagen is the important structural proteins in mammals with various peptide composition and cross-linkings. The direct analysis of collagen protein was not suitable because of its structural complexity and diversity. In this study, we suggest the simple way of collagen analysis by introducing matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to identify the collagen and its trypsin-digested fragments, and by subsequent time-of-flight tandem mass spectrometry(Q-TOF MS/MS) to analyze the amino acid sequences of identified fragments. Using the collagen samples extracted from the tail of mouse, 10 separated bands were found in SDS-PAGE, and the masses of most bands could be more finely determined by MALDI-TOF MS. When each 10 separated proteins was tryptic digested and introduced to MALDI-TOF, the Gly1056-Arg1073 fragment from α_1 -chain was identified in four bands, and the Gly1056-Arg1073 fragment from α_2 -chain was identified in five bands, both in type I collagen. Although few fragments were found because of the cross-linkings left in digested collagen sample, it could be determined that the type I collagen existed at least in 7 separated bands. When the amino acid sequences of two identified fragments were analyzed by Q-TOF MS/MS, both sequences were identical with those determined by MALDI-TOF MS. It suggested that the two peaks in MALDI-TOF MS caused by the fragments identified in this work could be used as the fingerprint to simply identify type I collagen in protein samples.

Key Words : collagen, mass spectrometry, MALDI-TOF, Q-TOF tandem MS, cross-linking

이 논문은 순천향대학교 교내연구과제(20040148)의 지원에 의하여 연구되었음.

¹순천향대학교 화학과

²순천향대학교 의과대학 생화학교실

³순천향대학교 의과대학 기생충학교실

*교신저자: 김성호(shkim71@sch.ac.kr)

1. 서 론

콜라겐은 포유동물을 구성하는 전체 단백질의 약 30%를 차지하는 구조단백질(structural protein)로서, skin, bone, cartilage, tendon 등의 결합조직(connective tissue)을 구성하여 인장강도와 같은 물리적 특성과 혈액응고 반응 단계의 활성화와 같은 생물학적 특성을 부여하는 섬유상 단백질(fibrous protein)이다[1, 2].

콜라겐은 존재하는 연결조직의 단백질 종류에 따른 다양한 형태의 α -chain이 존재하며 이들의 조합에 의해 type I-typeXVIII에 이르는 많은 종류의 콜라겐들이 형성되는데[3], 이중 두 개의 α_1 -chain과 한 개의 α_2 -chain으로 이루어져 있는 type I collagen은 skin, tendon, bone 등에서 발견되며 존재하는 collagen 중 가장 많은 비율을 차지한다[4-5]. 또한 콜라겐 내에는 이황결합(disulfide bond) 또는 수소결합(hydrogen bond) 형태의 많은 가교결합(cross-linking)을 가지고 있는데, 이러한 chain간 가교결합은 콜라겐의 기계적, 화학적 안정성의 특징을 나타내게 한다[6]. 이들 다양한 화학적·생물학적 특성들로 인해 콜라겐은 구조가 복잡하고 종류가 다양하다.

쥐의 꼬리에서 추출되는 콜라겐은 이러한 복잡·다양한 콜라겐의 성분 및 구조분석 연구에 많이 사용되고 있다. 대부분 type I의 구조를 갖는다고 알려진 쥐의 꼬리에서 추출된 콜라겐은 α_1 또는 α_2 -chain등의 서열 및 기능을 밝히는데 다양하게 이용되고 있다[7, 8]. 추출된 콜라겐을 분석하는 방법으로는 대부분 액체 크로마토그래피[9], SDS-PAGE[10], X-선 결정회절법[11] 등이 이용되어 왔으나, 콜라겐의 종류 및 성분을 직접적으로 분석하기 어렵고 그 전처리 과정 또한 복잡하였다.

이러한 생물 단백질의 분석에 있어서 최근 질량분석법(mass spectrometry)이 많이 이용되고 있다[12]. 특히 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량분석법(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)은 거대 생체분자에 대해서도 정확한 분자량 정보를 제공할 수 있고, 간단한 전처리만으로 다수의 시료분석이 가능한 장점을 가지고 있다[13-15]. 또한 이온화된 분자 중 특정 질량을 가진 분자만을 사중극자 분석기(quadrupolar analyzer)를 통해 선택한 후 이를 충돌 등에 의해 다시 조각화(fragmentation)시켜 이들 조각들의 질량을 비행 시간 분석법을 통해 분석하는 Q-TOF MS/MS 직렬 질량분석법(tandem MS)은 목적 분자에 대한 아미노산 서열 분석 등에 널리 응용되고 있다[16, 17].

본 연구에서는 콜라겐의 분석 및 확인에 MALDI-TOF MS를 도입하고자 하였다. 쥐의 꼬리로 부터 얻은

콜라겐 섬유에서 콜라겐을 분리한 후 gel 상에서 분자량 별로 분리하였다. 분리된 각각의 띠들을 채취한 후 trypsin을 이용한 digestion을 수행하여 MALDI-TOF MS 스펙트럼 상에서 digested fragment들을 분석하고, 확인된 fragment들에 대해 Q-TOF MS/MS를 사용하여 각각의 아미노산 서열을 분석하였다. 이를 통해 시료 중의 콜라겐의 종류에 대한 정보를 확인하고, 콜라겐 분석에서 MALDI-TOF 질량분석을 통해 α -chain의 종류 확인 및 이에 따른 시료 콜라겐의 종류를 쉽게 예측할 수 있는 방법을 제시하고자 하였다.

2. 실험

2.1 실험재료 및 시약

본 연구에서는 쥐의 꼬리에서 추출 및 정제한 콜라겐을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 Acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, Ammonium persulfate, Tris (Trizma base), Sodium dodecyl sulfate(SDS), Dithiothreitol(DTT), TEDED, Tris Buffer, Bromophenol blue, Coomassie Brilliant blue R 250, Ammonium bicarbonate(ABC), Trifluoroacetic acid(TFA), Glycine, Formic acid(FA)는 Sigma(U.S.A)에서, sinapinic acid (SA)은 Aldrich(U.S.A)에서 구입하였다. Trypsin(sequencing grade modified), Standard marker(SDS-PAGE standards, High Range)는 Bio-Rad(USA)사에서 구입하였다. 용매 Methanol, acetic acid glacial, acetonitrile(ACN)은 고순도 용매를 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 콜라겐의 정제

쥐의 꼬리를 비누로 간단히 씻은 후, 70% alcohol에서 5분간 소독하였다. 꼬리를 150 mm petri dish에 놓고 연골도를 써서 꼬리 끝에서부터 10 mm 간격으로 피부를 절개하였다. 상방으로 꼬리끝을 끌어 올리면 콜라겐 섬유가 따라 올라온다. 이를 절단하여 다른 petri dish에 들어 있는 0.1% acetic acid에 담갔으며, 이 과정을 반복하여 콜라겐 섬유를 모았다. 한 마리에서 나온 콜라겐(50~70 mg)을 100 ml acetic acid이 든 병에 옮긴 다음 4°C에서 magnetic stirrer로 24시간 교반하였다. 이 액을 2000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후 상층액을 옮겨 4°C에서 저장하였다.

2.2.2 SDS-PAGE

쥐의 꼬리에서 분리한 콜라겐을 SDS sample buffer에 녹이고 100°C에서 3분간 끓인 후 시료를 loading하기 위한 5% stacking gel과 sample를 분자량별로 분리

하기 위한 6% separating gel로 이루어진 discontinuous gel에 standard marker와 4°C에서 저장한 sample collagen을 각각 15 µl씩 loading하였다. Standard marker로는 myosin(206,676 Da), β-galactosidase(115,757 Da), Bovine serum albumin(98,003 Da), Ovalbumin(54,604 Da), Carbonic anhydrase(37,390 Da), Soybean trypsin inhibitor(29,559 Da), Lysozyme(20,336 Da), Aprotinin(7,036 Da)를 사용하였다.

2.2.3 In-gel digestion

Gel 상의 분리된 band를 잘게 잘라서 200 µl tube에 옮긴 후 증류수를 첨가해서 gel을 씻어준다. 30% methanol 0.5~1 ml로 gel band를 씻어준 후, 50% ACN/10 mM ABC 100~200 µl를 가하여 gel의 color를 완전히 제거한다. 상층액을 제거하고 100% ACN 가하여 squeeze한 후, Speed Vac으로 건조시킨다. 여기에 Trypsin 50 µl(Trypsin에 80 µl res.buff를 가한 후, 50 mM ABC 로 1/20 희석)를 첨가해서 30분간 냉장보관한 다음 37°C에서 16시간 배양하였다. 원심분리후 상층액을 취하여 50% ACN/0.1% FA 50 µl를 가하고 다시 원심분리후, 상층액을 취한다. 이러한 과정을 2~3번 반복하여 총 200~250 µl의 용액을 얻었다. 이를 Speed Vac으로 완전히 건조시킨 후 냉장보관 하였다.

2.2.4 질량분석

MALDI-TOF MS 장치는 Voyager DE-STR(PerSeptive Biosystems, USA)를 사용하였으며, Q-TOF MS/MS 장치는 JMS-HX110A(Jeol, Japan)을 사용하였다. 광원은 337 nm의 N₂ 레이저를 사용하였으며, 가속전압은 25 kV, 격자전압은 90%, 유도선 전압은 0.3%였다. 질량 측정시 보정은 외부 보정법을 사용하였으며, 108 kDa 분자량 범위에서 약 0.05~0.1%의 오차범위 이내에 있었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 SDS-PAGE와 MALDI-TOF MS를 이용한 콜라겐 시료의 분리·확인

쥐의 꼬리에서 채취한 콜라겐 시료를 SDS-PAGE로 분리한 결과를 그림 1에 나타내었다. 그림 1에서 Lane I은 standard marker에 의한 띠들이고, lane II에 콜라겐 시료의 분리된 띠들을 나타내었다. 콜라겐의 분리 결과 총 10개의 띠들을 확인할 수 있었는데, 이들의 분자량을 standard marker와 비교한 결과 각각 약 220 kDa, 95 kDa, 65 kDa, 47 kDa, 33 kDa, 30 kDa, 27 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 10 kDa 해당됨을 볼 수 있었다. 그러나

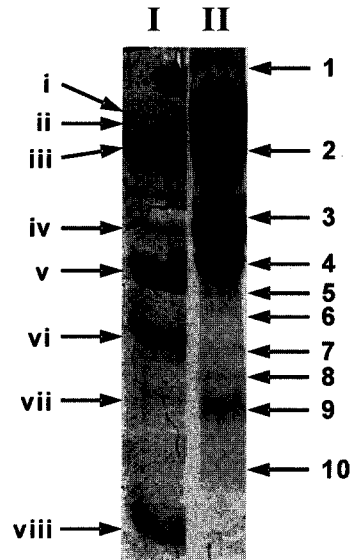


그림 1. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 SDS-PAGE 패턴. Lane 1에 나타난 standard marker의 band들은 각각 (i) myosin(206,676 Da), (ii) β-galactosidase(115,757 Da), (iii) bovine serum albumin(98,003 Da), (iv) ovalbumin(54,064 Da), (v) carbonic anhydrase(37,390 Da) (vi) soybean trypsin inhibitor(29,559 Da), (vii) lysozyme(20,336 Da), (viii) aprotinin(7,036 Da)에 해당된다.

band 2, 3, 4는 gel 상에서 넓은 범위의 띠를 형성함을 볼 수 있었는데, 이로 인해 정확한 분자량을 확인하기 힘들었다. 또한 band 10은 매우 희미하게 확인되어 분자량을 결정하기 어려웠다. 이를 볼 때 SDS-PAGE를 이용한 콜라겐 시료의 분석은 시료 내 분자들의 각 분자량에 따른 분리는 비교적 수월하나, 정확한 분자량에 대한 정보를 확인하기 어려움을 확인할 수 있었다.

동일한 콜라겐 시료를 m/z 10,000-250,000 범위에서 MALDI-TOF MS로 확인한 스펙트럼을 그림 2에 나타내었다. 그림 2에서 볼 수 있듯이 스펙트럼 상에서 peak들은 각각 m/z 11350.4814, 10071.6484, 13801.6436, 33088.7344, 66160.9375, 93993.0547, 216154.8281에서 확인되었다. 이를 동일한 시료를 가지고 분석한 그림 1의 SDS-PAGE 분석결과와 비교하면, m/z 216154.8281의 peak는 band 1에, m/z 93993.0547은 band 2에, m/z 66160.9375은 band 3에, m/z 47081.2266은 band 4에, m/z 33088.7344은 band 5에, 그리고 m/z 10071.6484는 band 10에 해당됨을 볼 수 있다. 그러므로 MALDI-TOF MS 스펙트럼에서는 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐을 분석한 결과 SDS-PAGE에서 확인된 총 10개의 band 중 60%에 해당하는 6개의 일치되는 많은 단백질을 확인할 수 있었다. 또한 standard marker와의 비교

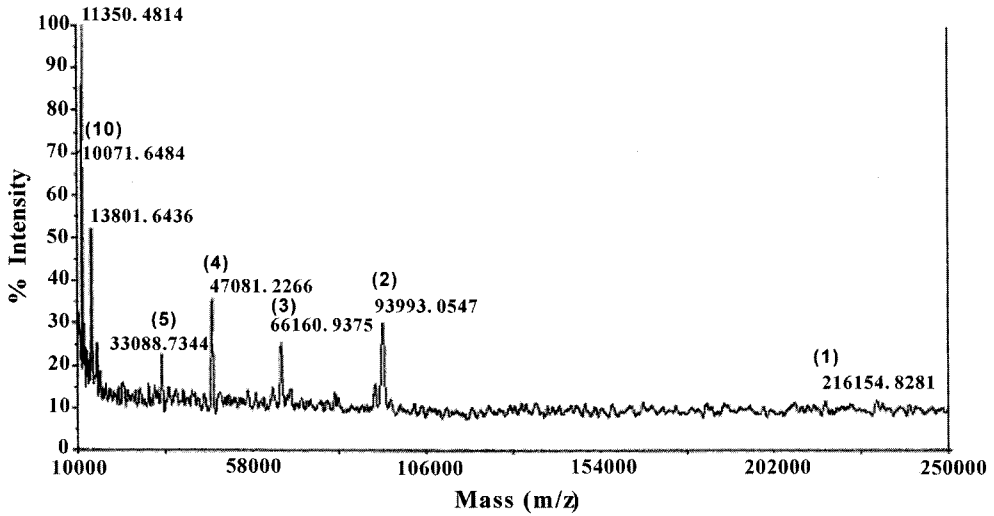


그림 2. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 MALDI-TOF MS 스펙트럼. 스펙트럼 내의 괄호안의 숫자는 그림 1의 SDS-PAGE 결과에서의 band number에 해당한다.

에 의해 대략적 분자량을 산출했던 SDS-PAGE에 비해 MALDI-TOF MS 결과에서는 각 단백질에 대해 매우 정확한 분자량 정보를 확인할 수 있음을 볼 수 있었다.

3.2 In-gel tryptic digestion 후의 MALDI-TOF MS SDS-PAGE에서 분리된 band들에 대해 in-gel trypsin

digestion 반응을 수행하게 되면 단백질의 아미노산 서열 중 Alanine과 Lysine 다음 자리에서 절단반응이 일어난다[12, 18]. 분리된 각 band들에 대해 이러한 proteolytic digestion 반응에 의해 얻어진 콜라겐의 fragment들을 MALDI-TOF MS로 분석한 결과를 각각 그림 3-그림 7에 나타내었고, 각 band에서 확인된 결과를 표 1에 요약하였다.

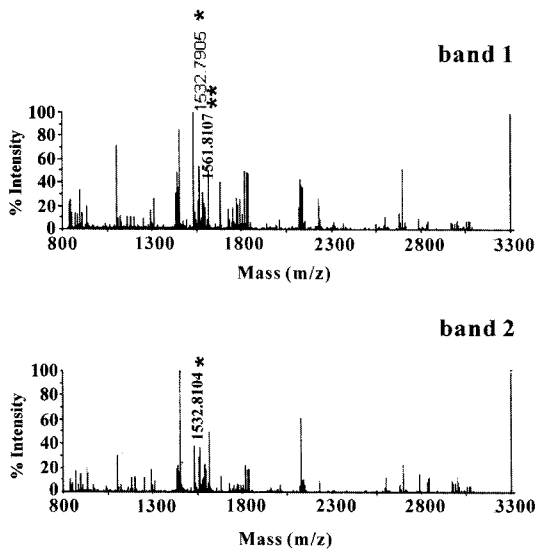


그림 3. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 SDS-PAGE 분리후 나타난 band 1과 band 2를 각각 젤 상에서 트립신으로 분해하여 확인한 MALDI-TOF MS 스펙트럼

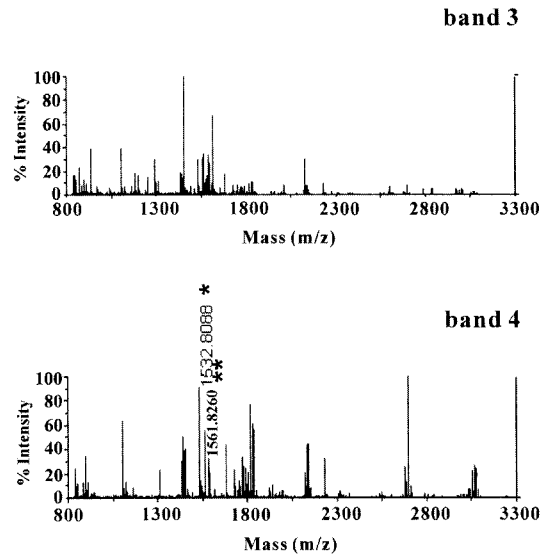


그림 4. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 SDS-PAGE 분리후 나타난 band 3과 band 4를 각각 젤 상에서 트립신으로 분해하여 확인한 MALDI-TOF MS 스펙트럼

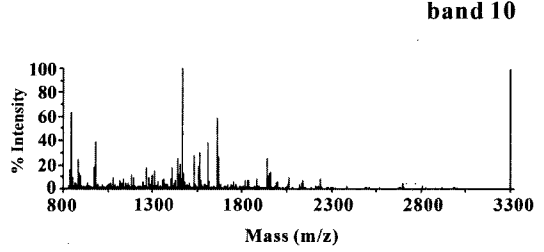
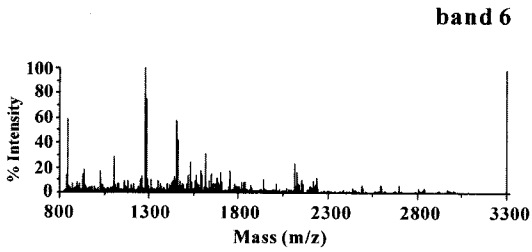
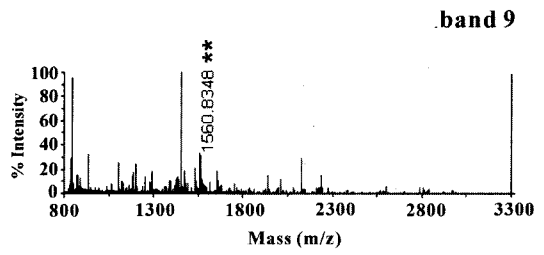
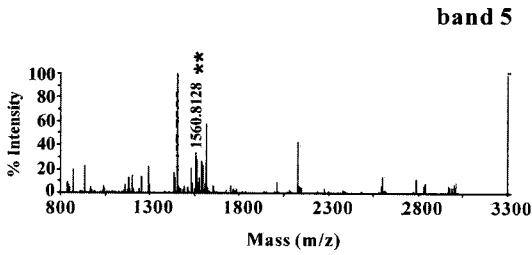


그림 5. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 SDS-PAGE 분리후 나타난 band 5와 band 6을 각각 젤 상에서 트립신으로 분해하여 확인한 MALDI-TOF MS 스펙트럼

그림 7. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 SDS-PAGE 분리후 나타난 band 9와 band 10을 각각 젤 상에서 트립신으로 분해하여 확인한 MALDI-TOF MS 스펙트럼.

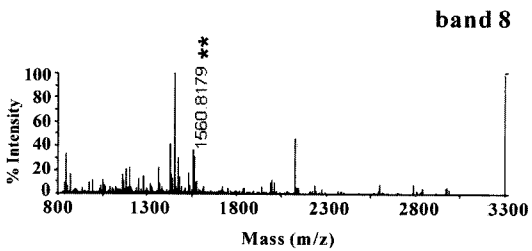
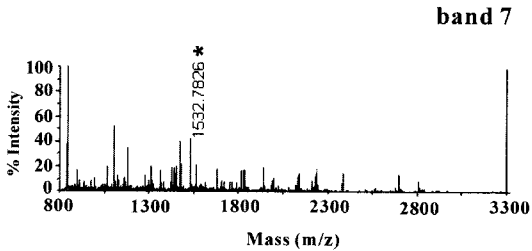


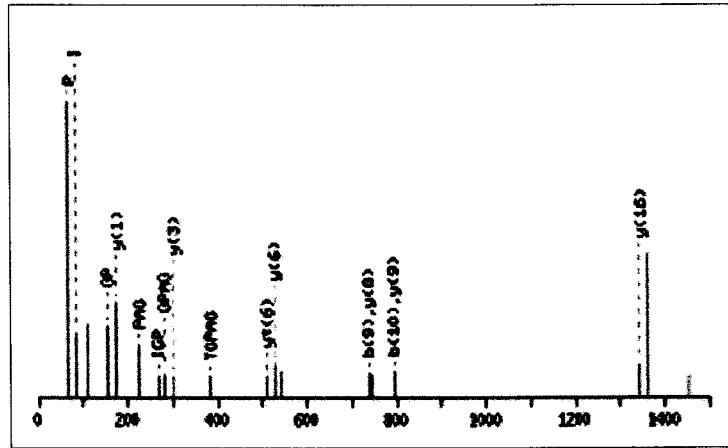
그림 6. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 SDS-PAGE 분리후 나타난 band 7과 band 8을 각각 젤 상에서 트립신으로 분해하여 확인한 MALDI-TOF MS 스펙트럼

표 1. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 SDS-PAGE 분리후 나타난 각 band들을 젤 상에서 트립신으로 분해한 뒤 MALDI-TOF MS 스펙트럼상에서 확인된 fragment들의 m/z 및 이에 해당하는 chain 형태

Band number in SDS-PAGE	Identified fragment peaks in MS (m/z)	Corresponding chain type
1	1532.7815	α_1
	1560.8128	α_2
2	1532.8104	α_1
3	not found	
4	1532.8088	α_1
	1560.8260	α_2
5	1560.8314	α_2
6	not found	
7	1532.7826	α_1
8	1560.8128	α_2
9	1560.8348	α_2
10	not found	

Band 1에 대한 MALDI-TOF MS 스펙트럼인 그림 3을 보면 여러 peak들이 관찰되고 있는데, 이들 측정된 결과를 예측된 콜라겐의 digested fragment의 질량과 비교했을 때, type I 콜라겐의 α_1 -chain에서의 예측된 fragment 중 1532.7815 Da를 가지는 Gly1056-Arg1073 서열이 m/z 1532.7905(*)에서, 그리고 type I 콜라겐의 α_2 -chain의 fragment 중 1560.8128 Da를 가지는

Gly985-Arg1002 서열이 m/z 1561.8107(**)에서 확인되었다. Band 2에 대한 MS 스펙트럼에서는 m/z 1532.8104에서 α_1 -chain 중의 Gly1056-Arg1073 서열을 확인 할 수 있었다. 그림 4에 나타난 band 4에 대한 분석에서의 peak 중 m/z 1532.8088에서 α_1 -chain fragment 중의 Gly1056-Arg1073 서열을, m/z 1560.8260에

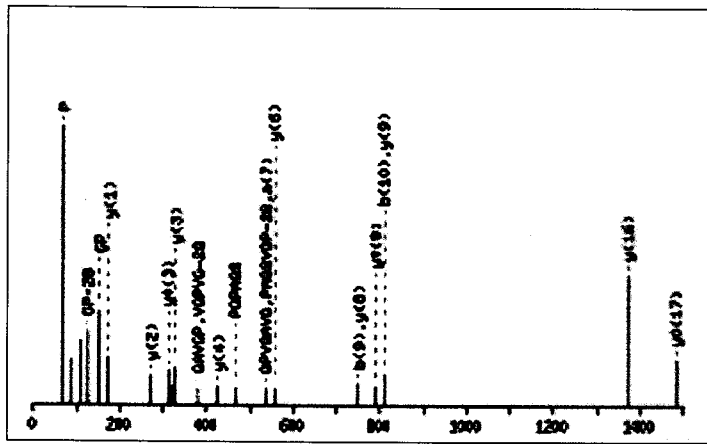


#	Immon.	a	a ₀	b	b ₀	Seq.	y	y*	y ₀	#
1	30.03	30.03		58.03		G				18
2	102.06	159.08	141.07	187.07	169.06	E	1475.76	1458.73	1457.75	17
3	74.06	260.12	242.11	288.12	270.11	T	1346.72	1329.69	1328.71	16
4	30.03	317.15	299.14	345.14	327.13	G	1245.67	1228.64		15
5	70.07	414.20	396.19	442.19	424.18	P	1188.65	1171.62		14
6	44.05	485.24	467.23	513.23	495.22	A	1091.6	1074.57		13
7	30.03	542.26	524.25	570.25	552.24	G	1020.56	1003.53		12
8	70.07	639.31	621.30	667.31	649.29	P	963.54	946.51		11
9	44.05	710.35	692.34	738.34	720.33	A	866.48	849.46		10
10	30.03	767.37	749.36	795.36	777.35	G	795.45	778.42		9
11	70.07	864.42	846.41	892.42	874.41	P	738.43	721.40		8
12	86.10	977.51	959.50	1005.50	987.49	I	641.37	624.35		7
13	30.03	1034.53	1016.52	1062.52	1044.51	G	528.29	511.26		6
14	70.07	1131.58	1113.57	1159.57	1141.56	P	471.27	454.24		5
15	44.05	1202.62	1184.61	1230.61	1212.60	A	374.22	357.19		4
16	30.03	1259.64	1241.63	1287.63	1269.62	G	303.18	286.15		3
17	44.05	1330.68	1312.66	1358.67	1340.66	A	246.16	229.13		2
18	129.11					R	175.12	158.09		1

그림 8. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 Gly1056-Arg1073 fragment(그림 3-그림7에서 *로 표시된)에 대한 Q-TOF MS/MS 스펙트럼 및 아미노산 서열 분석 결과

서 α_2 -chain fragment 중의 Gly985-Arg1002 서열을 확인할 수 있었으며, 그림 5의 band 5에서는 m/z 1560.8314에서 α_2 -chain fragment 중의 Gly985-Arg1002 서열을 확인할 수 있었다. 그림 6의 band 7에서의 peak들 중에서는 m/z 1532.7826에서 α_1 -chain fragment 중 Gly1056-Arg1073 서열을 확인할 수 있었으며, band 8의 결과에서는 m/z 1560.8128에서 α_2 -chain fragment 중 Gly985-Arg1002 서열을 확인할 수 있었다. 마지막으로 그림 7의 band 9에 대한 질량 스펙트럼에서는 m/z

1560.8348에서 α_2 -chain fragment 중 Gly985-Arg1002의 서열을 확인할 수 있었다. 그리고 band 3, 6, 10에 대한 질량분석 스펙트럼에서는 콜라겐 아미노산의 fragment 서열에 해당되는 peak를 확인할 수 없었다. 이들 각 band에서 얻은 스펙트럼 peak들의 분석을 종합하면 1, 2, 4, 7의 band에서는 콜라겐의 α_1 -chain으로부터 예상되는 fragment인 Gly1056-Arg1073 서열(*)이 확인되었고, 1, 4, 5, 8, 9의 band로부터는 콜라겐의 α_2 -chain으로부터 예상되는 Gly985-Arg1002 fragment(**)가



#	Immon.	a	a ₀	b	b ₀	Seq.	y	y*	y ₀	#
1	30.03	30.03		58.03		G				18
2	102.06	159.08	141.07	187.07	169.06	E	1503.79	1486.77	1485.78	17
3	70.07	256.13	238.12	284.12	266.11	P	1374.75	1357.72	1356.74	16
4	30.03	313.15	295.14	341.15	323.14	G	1277.70	1260.67	1259.69	15
5	70.07	410.20	392.19	438.20	420.19	P	1220.68	1203.65	1202.66	14
6	44.05	481.24	463.23	509.24	491.23	A	1123.62	1106.60	1105.61	13
7	30.03	538.26	520.25	566.26	548.25	G	1052.59	1035.56	1034.57	12
8	60.04	625.29	607.28	653.29	635.28	S	995.56	978.54	977.55	11
9	72.08	724.36	706.35	752.36	734.35	V	908.53	891.51		10
10	30.03	781.38	763.37	809.38	791.37	G	809.46	792.44		9
11	70.07	878.44	860.43	906.43	888.42	P	752.44	735.42		8
12	72.08	977.51	959.50	1005.50	987.49	V	655.39	638.36		7
13	30.03	1034.53	1016.52	1062.52	1044.51	G	556.62	539.29		6
14	44.05	1105.56	1087.55	1133.56	1115.55	A	499.30	482.27		5
15	72.08	1204.63	1186.62	1232.63	1214.62	V	428.26	411.24		4
16	30.03	1261.65	1243.64	1289.65	1271.64	G	329.19	312.17		3
17	70.07	1358.71	1340.70	1386.70	1368.69	P	272.17	255.15		2
18	129.11					R	175.12	158.09		1

그림 9. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐의 Gly985-Arg1002 fragment(그림 3-그림7에서 **로 표시된)에 대한 Q-TOF MS/MS 스펙트럼 및 아미노산 서열 분석 결과.

확인되었다.

그러나 그림 3-그림 7의 스펙트럼에서 α₁-chain은 총 65개의 가능한 fragment 중 1개의 fragment가 발견되어 전체 예측되는 fragment 중 1.53%에 해당되었고, α₂-chain은 총 63개의 fragment 중 1개의 fragment가 발견되어 1.58%에 해당되었다. 이러한 결과는 콜라겐의 결합구조에 기인하는 것으로 예상되는데, 콜라겐은 3개의 chain이 삼중 나선구조로 꼬여 있으며 각 chain들은 서로간의 가교결합으로 존재하고 있다[1, 6]. 실험에서는

콜라겐의 정제과정에서 산성 용액을 이용하여 이 가교결합을 끊고 분석을 수행하였으나, 가교결합을 끊는 반응이 완전하지 못할 경우 tryptic digestion에 의한 조각들이 가교결합에 의해 아직 연결된 채로 남아있게 된다. 이는 질량 스펙트럼을 분리된 각각의 콜라겐 사슬이 조각화된 것을 전제로 한 예상되는 fragment와 비교하기 어렵게 만들며, 이로 인해 확인되는 digested fragment의 수가 감소되는 것으로 예상할 수 있다. 10개의 분리된 band에서 확인된 fragment가 전체 예측가능한 fragment

중 1.5%에 해당한다는 것은 아직 분리된 콜라겐 내에 가교결합이 많이 남아있음을 예상할 수 있는데, 그럼에도 불구하고 SDS-PAGE상에서 확인된 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9의 band들에서 type I collagen의 α_1 -chain과 α_2 -chain 으로부터 예상되는 fragment들이 확인되었다는 것은, 적어도 이들 7개의 분리된 단백질은 type I 콜라겐으로 이루어져 있음을 확인할 수 있으며, type I 콜라겐을 MALDI-TOF MS로 분석할 때에 위의 두 fragment를 스펙트럼상의 지문(fingerprint)로 사용하여 간편하게 확인할 수 있음을 볼 수 있었다.

3.3 Tryptic digestion된 콜라겐 fragment의 Q-TOF MS/MS 서열분석 결과

MALDI-TOF MS 상에서 type I collagen 중의 서열로 확인된 두 fragment들에 대해 fragment의 아미노산 서열을 확인·검증하기 위하여, Q-TOF MS/MS 분석을 통해 Gly1056-Arg1073으로 확인된 fragment와 Gly985-Arg1002로 확인된 fragment의 서열을 확인하였으며, 그 결과를 그림 8과 그림 9에 나타내었다.

여기서 a와 b는 이온의 양전하가 N-terminal에 있는 상태에서 펩타이드 사슬 중 각각 C α -C와 C-N 간의 결합이 충돌유도 분리(collision-induced dissociation, CID) 과정에서 끊긴 펩타이드 조각들을 의미하며, y는 양전하가 C-terminal에 있는 상태에서 사슬 내 C-N 간의 결합이 끊긴 조각들을 의미한다. 아울러 낮은 질량 영역에서 발견되는 충돌에 의해 각 아미노산의 이모늄 이온(immonium ion)으로 분리된 단량체들의 확인된 질량을 같이 나타내었다. 이 Q-TOF MS/MS 결과를 볼 때, 그림 8에서의 스펙트럼 및 이의 분석결과는 type I 콜라겐 내 α_1 -chain에 속하는 fragment인 GETGPAGPAGPIGPAGAR의 서열과 일치하는 것을 확인할 수 있었으며, 그림 9에서의 결과에서는 type I 콜라겐 내 α_2 -chain에 속하는 fragment인 GEPGPA-GSVGPVGVAVGPR의 서열과 일치함을 확인할 수 있었는데, 이는 MALDI-TOF MS 분석에서의 peak를 예상된 fragment들과 비교하여 확인되었던 두 서열의 예측과 일치하고 있다. 이를 통해 쥐의 꼬리에서 추출된 콜라겐이 type I의 구조를 포함하고 있음을 확인할 수 있었고, 따라서 MALDI-TOF MS에서 확인된 α_1 -chain 내의 Gly1056-Arg1073과 α_2 -chain 내의 Gly985-Arg1002의 fragment에 해당하는 peak로서 type I collagen을 쉽게 확인할 수 있음을 검증할 수 있었다.

4. 결 론

큰 생체분자에 대해서 정확한 분자량 정보를 제공할

수 있고, 간단한 전처리만으로 다수의 시료분석이 가능한 MALDI-TOF MS를 이용하여 콜라겐 시료의 구조를 쉽게 확인할 수 있는 방법을 제시하고자 하였다. 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐 시료를 SDS-PAGE로 분리했을 때 10개의 band로 나누어지는 것을 확인할 수 있었는데, 동일한 콜라겐 시료를 MALDI-TOF MS로 분석한 결과 SDS-PAGE에서의 band와 질량이 일치하는 6개의 peak를 얻을 수 있었으며, 이들 단백질 분자들의 정확한 질량을 확인할 수 있었다. SDS-PAGE로 분리된 10개의 각 band에 대해 tryptic digestion을 수행한 후 MALDI-TOF MS로 확인한 결과, 4개의 band에서 type I 콜라겐의 α_1 -chain에 해당하는 Gly1056-Arg1073 fragment를 확인할 수 있었고, 5개의 band에서 α_2 -chain에 해당하는 Gly985-Arg1002 fragment를 확인할 수 있었다. 콜라겐 사슬간에 존재하는 가교결합으로 인해 예측되는 type I 콜라겐의 fragment 중 1.5%만이 확인되었지만, 두 확인된 fragment를 통해 SDS-PAGE에서 분리된 단백질 중 적어도 7개에서 type I 콜라겐이 존재함을 확인할 수 있었다. MALDI-TOF MS에서 예측값과의 비교로써 확인된 두 fragment의 아미노산 서열을 Q-TOF MS/MS로 확인한 결과 MALDI-TOF MS 분석결과와 동일한 서열분석 결과를 확인할 수 있었으며, 이를 통해 쥐의 꼬리에서 추출한 콜라겐에 type I collagen이 포함되어 있음을 확인함과 동시에, 이 두 digested fragment에 의한 MALDI-TOF MS 스펙트럼 상에서의 peak가 type I collagen 확인시의 지문으로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- [1] D. Byrom, Biomaterials, Mcmillan Publishers, UK, 1991.
- [2] M. E. Nimni, R. D. Harluess, Collagen Vol. 1: Molecular Structure and Functions of Collagen, CRC Press, USA, 1998.
- [3] M. A. Haralson, J. R. Hassel, Extracellular Matrix, Oxford Press, UK, 1995.
- [4] W. Friess, "Collagen-biomaterial for drug delivery", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 45, 113-116, 1997.
- [5] S. P. Oh, Y. Kamagata, Y. Muragaki, S. Timmons, A. Ooshima, B. R. Olsen, "Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4229-4233, 1994.
- [6] C. H. Lee, A. Singla, Y. Lee, "Biomedical applications of

collagen”, Int. J. Pharmaceut., 221, 1-22, 2001.

[7] D. J. McBride Jr., V. Choe, J. R. Shapiro, B. Brodsky, “Altered Collagen Structure in Mouse Tail Tendon Lacking the $\alpha_2(1)$ Chain”, J. Mol. Biol., 270, 275-284, 1997.

[8] K. A. Derwin, L. J. Soslowsky, J. H. Kiumra, A. H. Plaas, “Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structure in the mouse tail tendon fascicle”, J. Orthop. Res., 19, 269-277, 2001.

[9] A. H. Plaas, V. C. Hascall, R. J. Midura, “Ion exchange HPLC microanalysis of chondroitin sulfate: quantitative derivatization of chondroitin lyase digestion products with 2-aminopyridine”, Glycobiology, 6, 823-829, 1996.

[10] L. C. Rosenberg, H. U. Choi, L. H. Tang, T. L. Johnson, S. Pal, C. Webber, A. Reimer, A. R. Poole, “Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages”, J. Biol. Chem., 260, 6304-6313, 1985.

[11] B. Brodsky, S. Tanaka, E. F. Eikenberry, Collagen, Chemistry, Biology, and Biotechnology: X-ray diffraction studies as a tool for studying collagen, pp. 95-112, CRC Press, USA, 1988.

[12] R. Aebersold, D. R. Goodlett, “Mass Spectrometry in Proteomics”, Chem. Rev., 101, 269-295, 2001.

[13] M. Karas, F. Hillenkamp, “Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons”, Anal. Chem., 60, 2299-2301, 1988.

[14] D. C. Schriemer, L. Li, “Determination of High Molecular Weight Narrow Polydisperse Polymers up to 1.5 Million Daltons by MALDI Mass Spectrometry”,

Anal. Chem., 68, 2721-2725, 1996.

[15] S. Zhao, K. V. Somayajula, A. G. Sharkey, D. M. Hercules, F. Hillenkamp, M. Karas, A. Ingendoh, “Novel Method for Matrix-Assisted Laser Mass Spectrometry of Proteins”, Anal. Chem., 63, 450-453, 1991.

[16] K. Biemann, “Contributions of Mass Spectrometry to Peptide and Protein Structure”, Biomed. Env. Mass Spectrom., 16, 99-111, 1988.

[17] J. K. Eng, A. L. McCormack, J. R. Yates III, “An Approach to Correlate Tandem Mass Spectra Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database”, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 5, 976-989, 1994.

[18] J. Pappsilber, M. Mann, “What does it mean to identify a protein in proteomics?”, Trends in Biochem. Sci., 27, 74-78, 2002.

조 선 영(Seon-Young Cho)

[준회원]

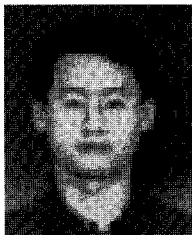


- 2003년 2월 : 순천향대학교 화학과 (이학사)
- 2005년 2월 : 순천향대학교 화학과 (이학석사)

<관심분야>
분광화학, 프로테옴 분석

김 광 연(Kwang-Yon Kim)

[정회원]

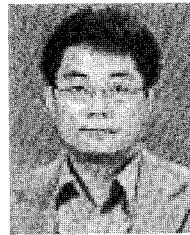


- 1992년 2월 : 연세대학교 화학과 (이학사)
- 1994년 2월 : 연세대학교 화학과 (이학석사)
- 2004년 2월 : 연세대학교 화학과 (이학박사)
- 2004년 3월~현재 : 순천향대학교 의공의료정보연구원 (연구원)

<관심분야>
계산화학, 프로테옴 분석기법 개발, 질량분석

이 상 한(Sang-Han Lee)

[정회원]



- 1986년 2월 : 순천향대학교 의학과 (의학사)
- 1989년 2월 : 순천향대학교 의학과 (의학석사)
- 1992년 2월 : 순천향대학교 의학과 (의학박사)
- 1991년 9월~현재 : 순천향대학교 의과대학 생화학교실 교수

<관심분야>
분자생화학적 종양학

남 해 선(Hae-Seon Nam)

[정회원]



- 1988년 2월 : 순천향대학교 의학과 (의학사)
- 1990년 2월 : 순천향대학교 의학과 (의학석사)
- 1994년 2월 : 순천향대학교 의학과 (의학박사)
- 1993년 3월~현재 : 순천향대학교 의과대학 기생충학교실 교수
- 2003년 3월~현재 : 순천향대학교 의료창업 보육센터 소장

<관심분야>

고부가 생물소재 개발 및 임상시험

김 성 호(Sung-Ho Kim)

[정회원]



- 1980년 2월 : 연세대학교 화학과 (이학사)
- 1987년 8월 : 연세대학교 화학과 (이학석사)
- 1991년 2월 : 연세대학교 화학과 (이학박사)
- 1993년 9월~현재 : 순천향대학교 화학과 교수
- 2000년 3월~현재 : 순천향대학교 의공의료정보연구원 원장

<관심분야>

분광화학, 질량분석, 프로테오믹 분석기법 개발, 생물소재 개발 및 분석, 분광분석법 개발