

저에너지 충돌 탄뎀 질량분석법을 이용한 올리고당의 연결구조 연구: 아세틸화 반응이 미치는 영향

劉 銀 順

호남대학교 환경원예학과
(1998. 1. 30 접수)

Structural Study of Oligosaccharides by Low Energy Collision Tandem Mass Spectrometry: Effect of the Acetylation Derivatization

Eunsun Yoo Yoon

Dept. of Environmental Horticulture, Honam University, Kwangju 506-714, Korea
(Received January 30, 1998)

요 약. 올리고당의 구조중 연결위치(linkage position)는 충돌 탄뎀 질량분석법(FAB CAD MS/MS: Fast Atom Bombardment Collision Activated Dissociation Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)을 이용하여 알 수 있다. 연결위치-이성질체 올리고당을 아세틸화시키면 자유올리고당보다 연결위치의 구별이 쉽고 독특한 분절이온 패턴을 얻을 수 있다. 그 이유는 연결위치에 따라 각 올리고당이 충돌에너지(collision energy)를 흡수하여 glycosidic 결합 주위를 회전하는 회전운동의 자유도가 달라지기 때문이다.

ABSTRACT. Linkage positions in oligosaccharides may be obtained by FAB CAD MS/MS (Fast Atom Bombardment Collision Activated Dissociation Mass Spectrometry/Mass Spectrometry). Acetylated derivatives of the linkage-isomeric trisaccharides exhibited more useful product ion patterns than the free trisaccharides and provided specific fragmentation patterns according to linkage positions. The reason for the useful linkage dependent spectra patterns of acetylated forms is related to the ability of each linkage in the oligosaccharides to absorb different levels of collision energy and rotational freedom of the individual glycosidic linkage.

서 론

세포표면에 당단백질이나 당지질 또는 프로테오글리칸의 형태로 존재하는 당질은 주로 올리고당 정도의 크기로 다양한 생물학적 기능과 관련이 있다고 밝혀지고 있다. 예를 들면, 세포표면에 존재하는 올리고당은 세포분화, 세포와 세포사이의 정보전달, 기질과 receptor사이의 상호작용, 바이러스와 박테리아로 인한 감염, 세포의 암(糖)화 및 암전이 등의 생명현상과 관련되어 있다.¹⁻⁶ 특히 세포가 암화될 때 수반되는 올리고당의 구조상의 변화는 구성당류간의 연결위치(linkage position)가 바뀌는 현상과 연결부위가 분지화되는 현상을 수반한다.^{4,7} 이들 생물학분야의 연구 결과에 바탕을 두고 최근 올리고당의 구조와 기능을 연결시키려는 방향으로 많은 관심을 갖게 되었다.

올리고당의 구성요소 중 연결부위 연구는 지금까지 화학적 방법이나 endoglycosidase 또는 exoglycosidase 등의 효소를 이용하여 연결부위를 끊어 준 후, 끊긴 부위를 methylation으로 유도체화시켜서 HPLC(High Performance Liquid Chromatography), 질량분석기(Mass Spectrometry)나 NMR(Nuclear Magnetic Resonance) spectroscopy를 복합적으로 이용하는 방법을 사용하여 왔다.⁸⁻¹² 이 분석법들은 첫째, 분석에 상대적으로 많은 시료량(mg 수준)이 요구되며 둘째, HPLC, MS나 NMR 등의 기기분석을 위해 여러 단계의 화학적 전처리 과정을 요한다는 단점을 지니고 있다. 암세포 등의 비정상적인 세포에서 얻을 수 있는 시료량을 고려하여 볼 때 보다 작은 양의 시료(μg 수준)와 최소한의 화학적 전처리 과정만으로 구조를 확인할 수 있는 분석법의 확보가 요구된다.

질량분석법은 올리고당을 포함한 비활성, 비휘발성 시료의 구조분석에 중요한 역할을 하는 것으로 시료분자를 이온화시키는 방법에 따라 EI(Electron Impact), CI(Chemical Ionization)과 FAB(Fast Atom Bombardment), MALDI(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), ESI(Electrospray Ionization) 등으로 나눌 수 있으며, 이들 중 FAB 이온화방식이 최소량의 이온화 에너지로 시료의 극성이나 활성여부와 상관없이 이용가능한 민감한 분석방법으로 인정받고 있다.¹³⁻²⁰ 또한 이온화실(ion chamber)내에서 위의 이온화 방법과 병행하여 시료를 양이온이나 음이온으로 이온화시킬 수 있으며 이때 생성되는 이온의 전하에 따라 Positive Mode 또는 Negative Mode로도 구분할 수 있다. 이렇게 생성된 각 이온의 질량과 존재량을 일차 질량스펙트럼을 통하여 알 수 있는 MS(Mass Spectrometry)방법과 여기서 얻은 이온 중 관심이 있는 특정이온을 다시 한번 아르곤등의 비활성 기체와 충돌시켜 특정이온에서 생성되는 분절이온들의 질량과 존재비율에 관한 정보를 얻을 수 있는 이차 충돌질량분석(CAD MS/MS: Collision Activated Dissociation Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)방법으로도 적용가능하다. 즉 질량분석법은 여러 분석기법을 조합하여 시료의 종류와 얻고자하는 정보에 따라 다양하게 사용될 수 있다. 이온화 과정시 EI나 CI 방법을 사용하면 glycosidic 연결위치의 분절 뿐아니라 단당류의 기본체인 오탄당이나 육탄당 자체의 분절도 일어나²¹ 스펙트럼 해석상에 어려움이 있게되므로 연결위치의 연구시에는 연결위치와 작용기 부위의 분절만 일어나는 FAB 방법을 사용하는 것이 바람직하다. FAB CAD MS/MS 분석법을 이용하여 연결위치를 구별하기 위한 간편하고 신속한 분석법을 개발하고자 하는 연구의 일환으로 올리고당에 금속양이온을 첨가하여 연결위치에 따른 금속양이온 결합 정도의 차이 연구에 이어²² 본 논문은 올리고당을 아세틸화시켜 올리고당내의 모든 수산화기(-OH)기를 아세틸기(CH₃COO-)로 바꾸어 주므로써 연결위치만 다른 일련의 올리고당들의 이온화 과정 및 이온화 과정에 영향을 미치는 요소들에 대해 연구하려는 목적을 지닌다. 특히 연결위치에 따라 연결위치 주변의 원자 밀집도(crowdiness)가 크게 달라지리라는 기반하에 FAB CAD MS/MS의 충돌에너지(collision energy) 정도를 달리하며 연결위

치의 분절 양상을 안정성 측면에서 연구하였다.

실 험

시약 및 기기. 실험에 사용한 시약은 Sigma Chemical사에서 구입한 것으로 일급내지는 특급제품으로 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

출발물질. 연결위치만 다른 구조이성질체인 6가지 올리고당은

L-fucosyl(α 1-3)-D-N-acetylglucosaminyl(β 1-3)-D-galactosyl(β 1-O-methyl): F3

L-fucosyl(α 1-4)-D-N-acetylglucosaminyl(β 1-3)-D-galactosyl(β 1-O-methyl): F4

L-fucosyl(α 1-6)-D-N-acetylglucosaminyl(β 1-3)-D-galactosyl(β 1-O-methyl): F6

D-galactosyl(β 1-3)-D-N-acetylglucosaminyl(β 1-3)-D-galactosyl(β 1-O-methyl): G3

D-galactosyl(β 1-4)-D-N-acetylglucosaminyl(β 1-3)-D-galactosyl(β 1-O-methyl): G4

D-galactosyl(β 1-6)-D-N-acetylglucosaminyl(β 1-3)-D-galactosyl(β 1-O-methyl): G6로

문헌의 방법²²으로 합성된 것이고 ¹³C-NMR을 이용하여 구조가 증명되었다. 본 논문에서는 각각 F3, F4, F6, G3, G4와 G6로 간략하여 사용한다.

아세틸화 과정(Acetylation).²⁰ 시료 올리고당 20 μ g을 취하여 마이크로 시험관에 넣고 pyrimidine-acetic anhydride(1:1)혼합물 20 μ l를 가하여 실온에서 하룻밤 반응시킨 후 질소기체로 건조시킨다. 건조된 시료를 MeOH-CHCl₃(1:1)용액 20 μ l에 용해시킨다. 구리로 된 FAB 탐침(probe) 끝에 glycerol 1 μ l를 얇게 펴 놓은 후 용해된 시료 1 μ l를 취하여 그위에 더해준다.

질량분석기(MS: Mass Spectrometry). FAB(Fast Atom Bombardment) 질량분석 스펙트럼은 표준 FAB 이온발생원(source)을 장착한 Finnigan TSQ-70 triple quadrupole mass spectrometer와 DS90 data system으로 얻었다. 시료에 충돌하는 기체로는 xenon을 사용하였고 FAB gun(ION-Tech)은 8-9 KeV로 작동시켰다.

FAB CAD MS/MS. CAD(Collision Activated Dissociation)연구는 충돌기체로써 아르곤을 사용하였으며 실험기간중 일정하게 0.8 mtorr의 압력을 유지하

였고, collision 에너지는 -10 eV에서 -100 eV까지 10 eV씩 변화시키며 분석하였다. 각 시료의 스펙트럼은 m/z 150에서 m/z 950 범위를 3초 동안 scan하여 얻었으며, CAD 측정을 위해서는 m/z 150에서 m/z 950까지 각각의 collision 에너지 단계에서 5초 동안 scan한 것을 평균하여 얻었다.

결과 및 고찰

아세틸화된 F3, F4와 F6(AF3, AF4와 AF6). 연결위치만 다른 일련의 올리고당들을 아세틸화시킨 후, 질량분석기로 시료에 가하는 에너지정도를 달리 하며 연결위치에 따른 분절현상의 패턴을 연구하였다. Fig. 1은 -60 eV의 충돌(collision)에너지수준에서 아세틸화 시킨 F3(AF3: acetylated fucosyl(α 1-3) N-acetylglucosaminyl(β 1-4)galactosyl-OCH₃), 아세틸

화 시킨 F4(AF4: acetylated fucosyl(α 1-4)N-acetylglucosaminyl(β 1-4)galactosyl-OCH₃)와 아세틸화 시킨 F6 (AF6: acetylated fucosyl(α 1-6)N-acetylglucosaminyl (β 1-4)galactosyl-OCH₃)의 FAB CAD MS/MS 스펙트럼이다. 연결위치에 상관없이 이들은 m/z 880에서 모두 같은 [M+H]⁺ 분자이온을 보이며 m/z 560과 m/z 273에서 공통된 분절이온을 보인다. 구조이성질체인 각 올리고당에 있어 분자이온의 생존률(survival rate: 분절되지 않고 분자이온 상태로 남아있는 비율)은 충돌에너지 수준을 증가시킴에 따라 연결위치에 따라 각기 다르게 감소되어, -60 eV에서 AF6가 가장 높은 m/z 880의 생존률(60%)을, AF4는 중간수준(40%), AF3는 가장 낮은 생존률(20%)을 보여준다. 이 결과는 자유올리고당⁹이나 메틸화 시킨 올리고당²⁴의 FAB CAD MS/MS 스펙트럼의 결과와 동일한 양상으로 1-6연결위치를 포함한 F6가 각 작용기의 화학적 대체여부에 상관없이 가장 안정하며, 1-3연결위치를 지닌 F3가 가장 불안정한 구조임을 시사해 준다.

아세틸화된 구조이성질체 올리고당들의 공통 분절이온인 m/z 560 이온은 a-type 경로¹¹에 의하여 아세틸화된 GlcNAc(N-acetyl glucosamine)과 아세틸화된 galactose 사이의 glycosidic 결합이 분절되고 수소이온 하나가 아미노당에서 아세틸화된 galactose로 이동함으로써 아세틸화된 GlcNAc의 oxonium ion 형태를 형성한 것이다(Fig. 2). 분자이온(m/z 880)에서 b-type의 경로¹¹를 거쳐 아세틸화된 fucose와 아세틸화된 GlcNAc 사이의 glycosidic 결합이 분절되며 아세틸화된 fucose 부분이 손실됨과 동시에 수소이온 하나가 GlcNAc에 첨가되어 m/z 608 peak가 형성된다. 이 peak는 -60 eV에서 1-3연결위치를 지니는 AF3에서만 나타나서 1-3연결위치가 1-4나 1-6에 비해 상대적으로 불안정함을 시사해 준다. 일차분절이온인 m/z 560 이온에서, 이차분절이온인 m/z 273, m/z 213, m/z 153 이온이 생성되는데 m/z 273 peak는 a-type 경로를 통해 아세틸화된 fucose와 GlcNAc 사이의 glycosidic 결합이 끊어지며 형성된 아세틸화된 fucose의 oxonium ion 형태이다. 이 아세틸화된 fucose의 oxonium 형태는 자유올리고당⁷이나 메틸화된 경우²³에는 볼 수 없고 아세틸화한 경우에만 나타나는 것으로, 아세틸화된 것의 분절은 전기음성도보다는 원자들의 밀집도에 더 큰 영향을 받음을 시사

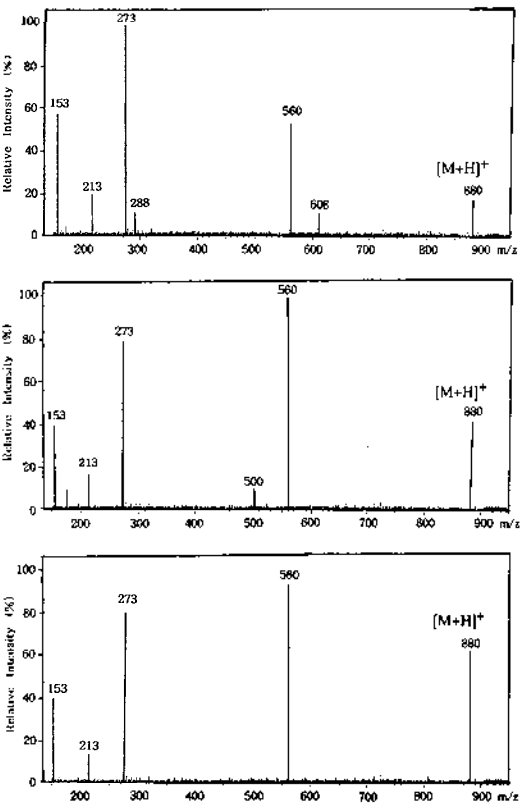


Fig. 1. -60 eV의 충돌에너지 및 0.8 mtorr의 Ar 기체 압력 수준에서 얻어진 AF3(위), AF4(가운데)와 AF6(아래)의 양이온 탄뎀 질량분석 스펙트럼.

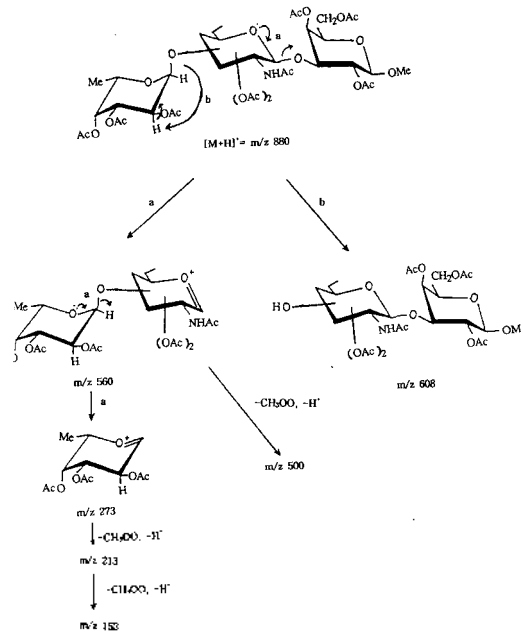


Fig. 2. AF3, AF4와 AF6의 분절경로(Fragment Pathway).

해 준다. AF4의 경우는 독특하게 m/z 560 이온에서 아세틸기 하나와 수소이온 하나가 손실된 m/z 500 peak를 형성하며 이 이온은 1-4연결위치의 포함여부를 시사해 주는 지표역할을 한다. 이와 유사하게 메틸화시킨 경우에는 1-3연결위치를 지닌 올리고당만이 독특한 지표이온을 나타내었다.²⁴ 이차분절이온인 m/z 273 peak로부터 연속적으로 아세틸기와 수소이온 하나씩을 잃어 버리고 불포화 상태가 되어 m/z 213과 m/z 153 peak를 연이어 형성한다.

아세틸화된 G3, G4와 G6(AG3, AG4와 AG6).

Fig. 3은 -60 eV의 충돌에너지(collision energy) 수준에서 아세틸화 시킨 G3(AG3: acetylated galactosyl(β1-3)N-acetylglucosaminyl(β1-4)galactosyl-OCH₃), 아세틸화 시킨 G4(AG4: acetylated galactosyl(β1-4)N-acetylglucosaminyl(β1-4)galactosyl-OCH₃)와 아세틸화 시킨 G6(AG6: acetylated galactosyl(β1-6)N-acetylglucosaminyl(β1-4)galactosyl-OCH₃)의 FAB CAD MS/MS 스펙트럼이다. 기대한 바와 같이 AG3, AG4와 AG6 모두 m/z 938에서 [M+H]⁺의 분자이온을 보이며 AFX(X=3, 4 또는 6)올리고당과 동일한 연결위치에 따른 분절패턴을 보여 준다. m/z 558 peak는 1-4연결부위의 특징적인 이온으로 AF4의 m/

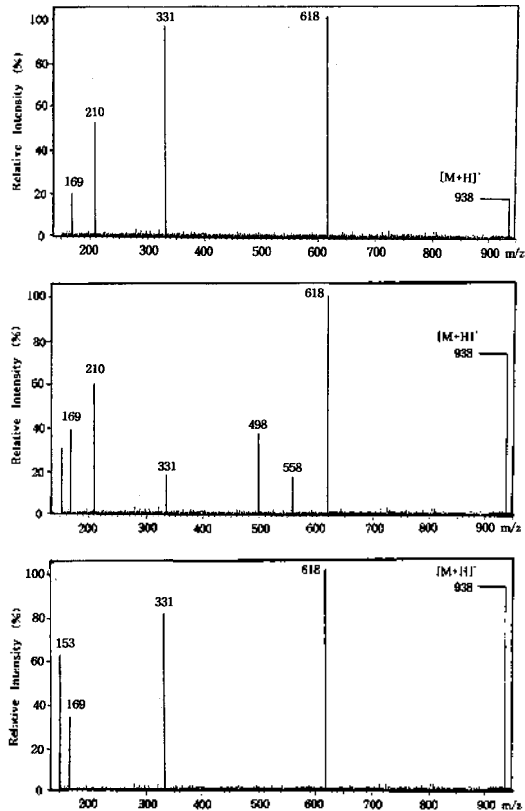


Fig. 3. -60 eV의 충돌에너지 및 0.8 mtorr의 Ar 기체 압력 수준에서 얻어진 AG3(위), AG4(가운데), AG6(아래)의 양이온 tandem 질량분석 스펙트럼.

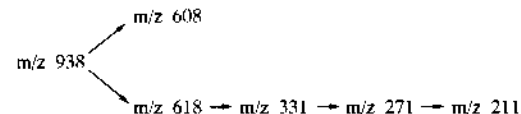


Fig. 4 AF3(Acetylated F3)와 AF6(Aetylated F6)의 분절 경로.

z 500 peak에 상응하는 것이며 1-3연결위치와 1-6연결위치의 경우 거의 동일한 분절패턴을 보여주나 각 이온의 존재비율에는 차이가 있다(Figs. 3-5).

AFX 올리고당과 AGX 올리고당은 구조상으로 말단 당당류의 종류가 다를 뿐 아니라 말단 당당류와 가운데 GlcNAc을 연결하는 연결위치의 아노머(α 또는 β 형태)형태의 차이도 있으나 FAB CAD MS/MS 스펙트럼상의 분절현상은 동일한 형태를 보여 이는 분절현상이 아노머 형태보다는 연결위치에 더 큰 영향을 받는 듯이 보인다. AGX 올리고당의 경우에도

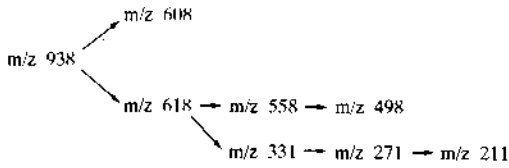


Fig. 5. AF4(Acetylated F4)의 분절경로.

충돌에너지 수준을 달리하며 연결위치의 분절율을 살펴 본 결과, 1-3연결위치 지닌 것이 가장 쉽게 분절이 일어나며 1-4연결위치 지닌 것은 중간정도, 1-6연결위치 지닌 것은 가장 적게 분절이 일어나 안정도 면에서 AFX 올리고당과 같은 일관성을 보여 주었다.

결론

본 연구는 연결위치만 다른 일련의 구조이성질체 올리고당을 대상으로 연결위치의 차이를 알아보기 위하여 올리고당을 아세틸화 시킨후, 충돌에너지 수준을 달리하여 FAB/CAD MS/MS로 연구하였다. 아세틸화시킨 경우에 1-3연결위치가 가장 쉽게 분절이 일어났다. 순수한 올리고당이나 대체되는 작용기가 상대적으로 작은 메틸화의 경우에는 연결위치의 분절현상이 아미노당인 GlcNAc의 아미노기 주변에 전하의 영향으로 일어난다고 보고되었으나,²² 대체작용기가 상대적으로 큰 아세틸화의 경우는 연결부위 주변의 원자밀집으로 인한 연결부위 회전운동에 미치는 장애정도에 더 큰 영향을 받는 것으로 사료된다. 앞으로 molecular modeling을 통한 구조적 형태의 연구가 후속적으로 뒷바침되어야 할 것이다.

인용문헌

1. Uysal, H.; Saxton, J.; Hemming, F. W. *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 439.
2. Miller-Podraza, H.; Bergstrom, J.; Milh, M. A.; Karlsson, K-A. *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 439.
3. Choo, Y. K.; Chiba, K.; Tai, T.; Ogiso, M.; Hoshi, M. *Glycobiology*, **1995**, *5*, 299.
4. Hakomori, S.; Igarashi, Y.; Kojima, N.; Okoshi, H.; Handa, K.; Fenderson, B. *Glycoconjugate J.* **1991**,

- 8, 179.
5. England, P. T. *Ann. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 121.
6. Hakomori, S. *Adv. Cancer Res.* **1989**, *52*, 257.
7. DeFrees, S. A.; Kosch, W.; Way, W.; Paulson, J. C.; Sabesan, S.; Halcomb, R. L.; Huang, D.; Ichikawa, Y.; Wong, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 66.
8. Kaptein, R.; Dijkstra, K.; Nicolay, K. *Nature*, **1978**, *274*, 293.
9. Laine, R. A.; Pamidimukkala, K. M.; French, A. D.; Hall, R. W.; Abbas, S. A.; Jain, R. K.; Matta, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 27.
10. Jain, R. K.; Vig, R.; Rampal, R.; Chandrasekaran, E. V.; Matta, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12123.
11. Lemieux, R. U.; Bock, K.; Delbaere, L. T.; Koto, S.; Rao, V. S. *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 631.
12. Nelson, R. W.; Krone, J. R.; Bieber, A. L.; Williams, P. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1153.
13. Grese, R. P.; Cerny, R. L.; Gross, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2835.
14. Laine, R. A. *Methods in Enzymology* **1989**, *179*, 157.
15. Tomer, K. B. *Mass Spectrometry Review* **1989**, *8*, 483.
16. McLaffery, F. W. *American Society for Mass Spectrometry* **1990**, *1*, 1.
17. Dell, A.; Carman, N. H.; Tiller, P. R.; Thomas-Oates, J. E. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 19.
18. Dell, A.; Rogers, M. E. *Trends in Analytical Chemistry* **1989**, *8*, 375.
19. Domon, B.; Muller, D. R.; Richter, W. J. *Organic Mass Spectrometry* **1989**, *24*, 357.
20. Domon, B.; Muller, D. R.; Richter, W. J. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1990**, *100*, 301.
21. Gillette-Castro, B. L.; Burlingame, A. L. *Methods in Enzymology* **1990**, *193*, 689.
22. Yoon, E. *J. Kor. Chem. Soc.* **1996**, *40*, 557.
23. Jain, R. K.; Kohata, K.; Abbas, S. A.; Matta, K. L. *Carbohydr. Res.* **1988**, *172*, 27.
24. Yoon, E.; Laine, R. A. *Biological Mass Spectrometry* **1992**, *21*, 479.
25. Mallis, L. M.; Russel, D. H. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1076.