

다중 질량 분석법을 이용한 인체 면역글로불린 G의 N-연결 글라이칸 분석

¹주 황 수 · ²김 윤 곤 · ²장 경 순 · † ^{1,2}김 병 기

¹서울대학교 공과대학 화학생물공학부, ²서울대학교 공과대학 협동과정 생물화학공학 전공
(접수 : 2007. 4. 13., 게재승인 : 2007. 8. 16.)

Tandem Mass Spectrometry of N-linked Glycans from Human Immunoglobulin G

Hwang-Soo Joo¹, Yun-Gon Kim², Kyoung-Soon Jang², and Byung-Gee Kim†^{1,2}

¹School of Chemical & Biological Engineering,

²Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology,

Seoul National University, Kwanak-Gu, Seoul 151-742, Korea

(Received : 2007. 4. 13., Accepted : 2007. 8. 16.)

We used electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry (ESI-IT tandem MS) to structural elucidation of three different biantennary-type glycans having zero, one, two galactoses (G0, G1, G2). The highest fragment ion in the MS/MS spectra of three glycans was produced by 0,2-ring cleavage of fucose-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) in reducing end. The fragment ions both from precursor ions and 0,2-ring cleaved ions (^{0,2}A_n; n=5 for G0, n=6 for G1 and G2) were not overlapped each other. As results of MSⁿ analyses, tandem fragmentation trees of each glycans were generated and 2,4-ring cleavages (^{2,4}A₆) were occurred in GlcNAc linked to reducing end GlcNAc. This structural elucidation and fragmentation study of N-linked glycans by tandem mass spectrometry can be applied to structural analysis of more complicated glycans.

Key Words : Tandem mass spectrometry, human immunoglobulin G, N-linked glycan

서 론

인체 면역글로불린 G (이후 IgG)는 인체 내 혈청에 존재하면서 면역 반응에 관여하는 대표적인 항체로 전사 후 수식에 의해 297번째 아미노산인 아스파라긴에 글라이칸이 연결되어 있다(1). 인체 IgG에는 약 30가지 이상의 복합 이중축각 구조의 글라이칸들이 밝혀져 있고(2), 이 중 비환원 말단쪽에 갈락토오스가 없거나 1개, 2개인지에 따라 G0, G1, G2의 세가지 타입으로 구분될 수 있다(3). 지금까지 이와 같은 다양한 구조를 갖는 IgG 글라이칸의 서열, 구조, 조성 등에 대한 다각도의 분석이 많은 연구 그룹들에 의해 젤 전기영동, 액체 크로마토그래피, 질량 분석 기법 등을 이용해 이루어져 왔다(3-6). 특히 단백질체학 분야에서 많은 각광을 받고 있는 매트릭스 보조 레이저 탈착/

이온화 질량분석기 방법과 전극분무 이온화 질량분석기 방법을 이용한 질량 분석 기법은 펩타이드의 서열 분석과 비슷한 방법으로 글라이칸의 쪼개짐을 이용해 빠르게 그 서열과 구조를 유추할 수 있는 장점이 있다(7). 이와 같은 MS/MS 기법은 그 자체로도 충분한 구조, 서열 정보를 제공하지만 이온 포획 질량 분석 기법을 이용한 다중 쪼개짐 질량 분석 방법을 통해 MS/MS 분석으로 유추된 글라이칸의 구조를 재확인하는 구조 해석 정보를 얻을 수 있다(8).

본 연구에서는 이와 같이 질량 분석기를 이용해 인체 IgG의 N-연결 글라이칸의 양이온 프로파일을 보고 이 중 비환원 말단에 갈락토오스의 개수가 0개, 1개, 2개이면서 나머지 구조는 전부 같은 3개의 글라이칸을 집중적으로 구조 분석에 이용하였다. 글라이칸의 구조 분석은 전극분무 이온화-이온 포획 질량 분석기를 사용하여 첫째로 MS/MS 분석을 통한 서열 분석을 수행하였고, 둘째로 다중 쪼개짐 질량 분석 기법 (MSⁿ)을 통해 MS/MS로 유추한 서열을 재확인하였고, 마지막으로 그 과정에서 글라이칸 분자의 쪼개짐 현상에 대한 고찰을 하였다.

† Corresponding Author : School of Chemical & Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Tel & Fax : +82-2-880-6774

E-mail : byungkim@snu.ac.kr

재료 및 방법

이 실험에 사용된 모든 물은 3차수를 사용하였고, 유기 화합물 및 용매는 분석 시약용 제품을 구입하여 사용하였다. IgG는 Sigma로부터 구입하였고, N-glycan을 IgG로부터 이탈시키는데 사용된 N-glycosidase F는 Roche로부터 구입하였다.

효소를 이용한 IgG로부터 N-glycan의 이탈 반응

25 mM의 암모늄 바이카보네이트 완충액 (pH 7.2)에 IgG를 1 mg/mL의 농도로 녹인 후, 끓는 물에 5분 넣어서 단백질의 3차 구조를 허물어 효소 반응이 용이하게 하였다. 상온까지 식힌 후 5 mg의 IgG당 1 unit의 N-glycosidase F를 첨가하여 37°C에서 16시간 반응시켰다. 반응 후 미리 -20°C에 넣어 두었던 에탄올을 반응 용액 부피의 4배 첨가하여 -20°C에 2시간 정치시켰다. 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 상등액을 진공 원심분리기로 건조시켰다. 건조된 시료는 3차수로 용해시켜 질량 분석에 사용하였다.

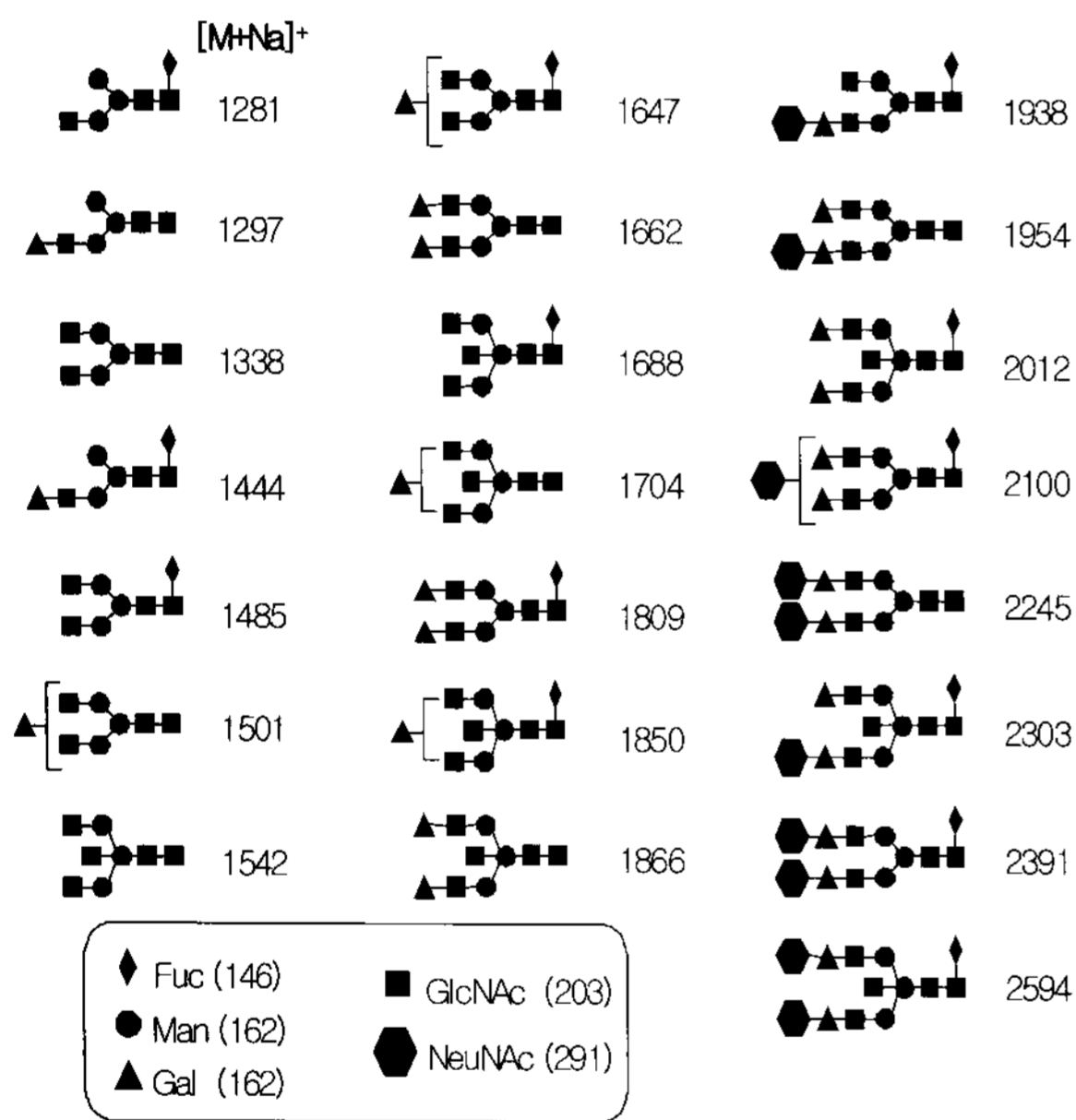


Figure 1. N-linked glycans of human immunoglobulin G.

매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 질량 분석기 방법

매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 질량 분석기에 사용된 유기 매트릭스, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB; 30 mg/mL)는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 용매 (methanol : water = 4 : 1)에 녹여 사용하였으며, 시료 준비는 dried droplet 방법을 이용하여 제조하였다. 사용된 질량 분석기는 337 nm 질소 레이저가 장착된 Biflex IV (Bruker, Bremen, Germany)를 이용하여 양이온 모드에서 분석하였다. 사용된 레이저의 세기는 최적 분해능 및 신호대 잡음비를 가질 수 있도록 30%에서 50% 사이에서 적절하게 사용하였다. 또한 분석된 스펙트럼은 100번 조사를 한 평균치를 취하였으며 분석 전 질량 분석기의 질량 보정은 bradkynin 2-9 (Mw;

903.4603), angiotensin I (Mw; 1295.6774), adrenocorticotrophic hormone rat fragment 1-16 (Mw; 1935.9776) and adrenocorticotrophic hormone fragment 18-39 (Mw; 2464.1909)로 구성된 혼합물을 가지고 수행하였다.

전극분무 이온화 질량 분석기 방법

미세관 액체 크로마토그래피 (Agilent 1100, Palo Alto, CA)가 장착된 LCQ DECA-XP 이온 트랩 질량 분석기 (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)를 이용하여 양이온 모드에서 분석하였다. 이동상 용매는 메탄올과 물의 일대일 혼합 용매를 5 µl/min 속도로 사용하였다. 주입된 시료의 부피는 1~5 µl로 하였으며 질량 분석기의 분석 조건은 기존의 분석 방법을 대부분 그대로 사용하였다(8). 보다 자세한 세부 조건은 다음과 같았다(분무 전압: 5 kV, 질소 가스 유속: 15 AU, 이온주입 미세관 전압: 25 V, 이온 전달 미세관 온도: 275°C, 다중 질량 분석을 위한 이온 격리 폭: 1.5 Da, 충격 에너지: 30~40%).

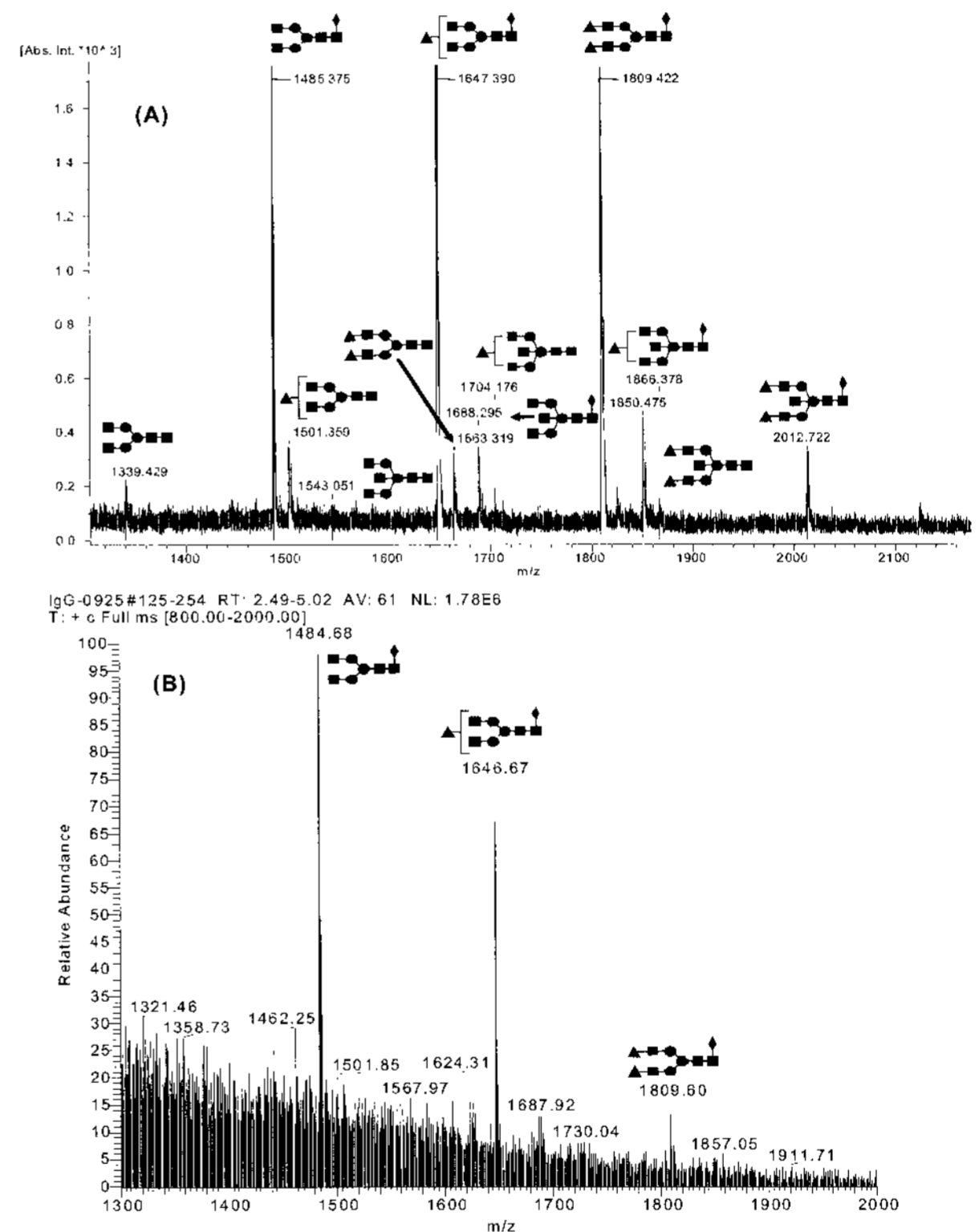


Figure 2. Positive ion MS spectrum of N-linked glycans measured by MALDI-TOF MS (A) and ESI-ion trap MS (B).

결과 및 고찰

매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 질량분석기와 전극분무 이온화 질량분석기를 이용한 IgG의 N-연결 글라이칸 프로파일링

IgG의 글라이칸은 서론에서 언급한 바와 같이 여러가지의 다른 구조를 가지고 있으며 그 구조에 따라 분자량이 달라지므로 질량 분석기를 이용하여 쉽게 프로파일링을

할 수 있다(Fig. 1). 본 연구에서는 먼저 매트릭스 보조 레이어 탈착/이온화 질량분석기를 이용하여 IgG의 N-글라이칸의 양이온 모드에서의 프로파일을 확인하였다(Fig. 2-A). 그 결과 모든 피크가 수소가 아닌 나트륨 이온으로 양이온화된 형태로 나타났으며, 이는 기존 다른 연구 그룹의 결과와 같았다(9). 또한 피크 세기에 차이가 있었는데 m/z 1485, 1647, 1809의 3개의 피크가 가장 높은 세기를 나타냈으며 이 3개의 피크는 각각 이중축각구조의 비환원 말단에 갈락토오스가 0개, 1개, 2개 결합된 글라이칸에 해당했다. 같은 시료를 전극분무 이온화 질량분석기로 프로파일링한 결과도 역시 이 3개의 피크가 가장 높은 세기를 보였고(Fig 2-B), 이후의 다중 쪼개짐 질량 분석에서 이 3개의 피크를 비교 분석하기로 결정하였다.

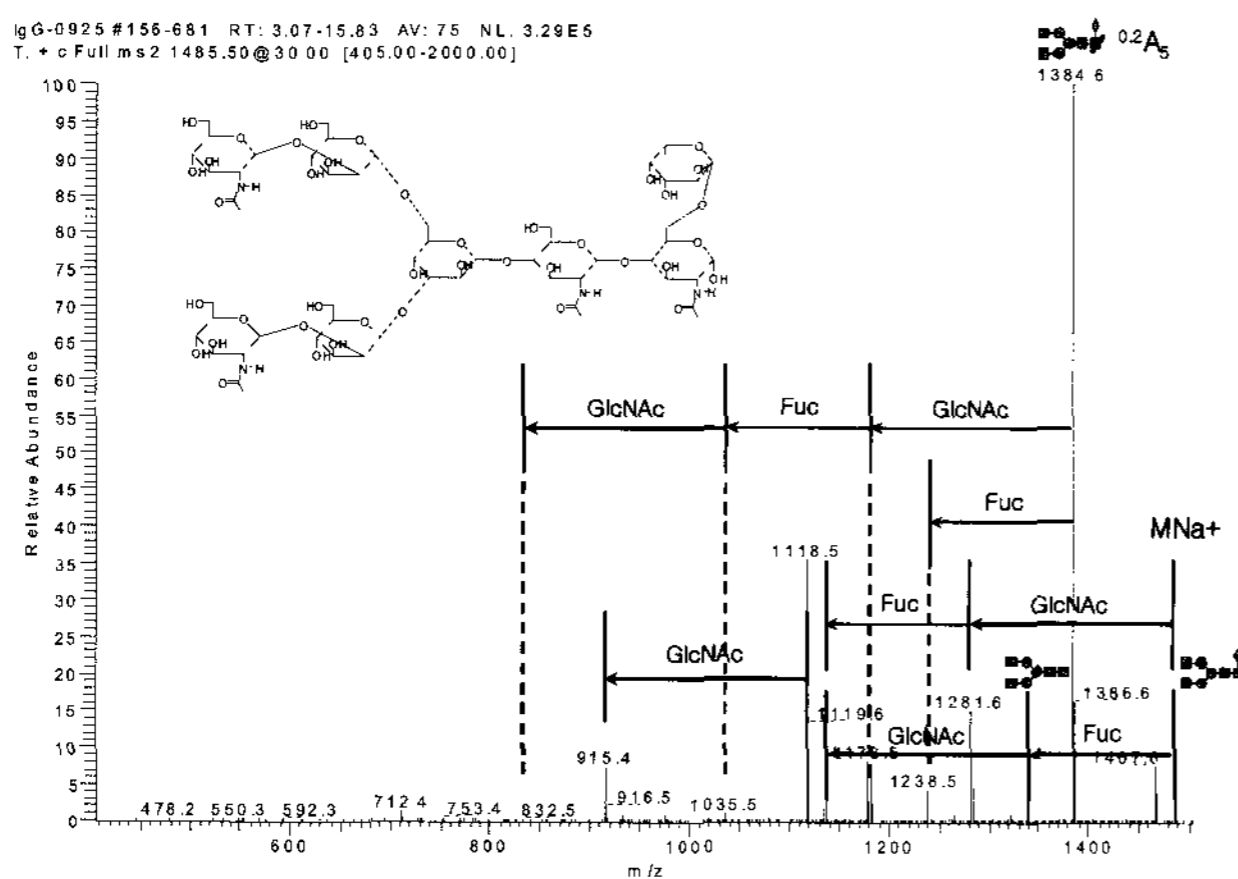


Figure 3. MS/MS spectrum and chemical structure of G0 glycan at m/z 1485.

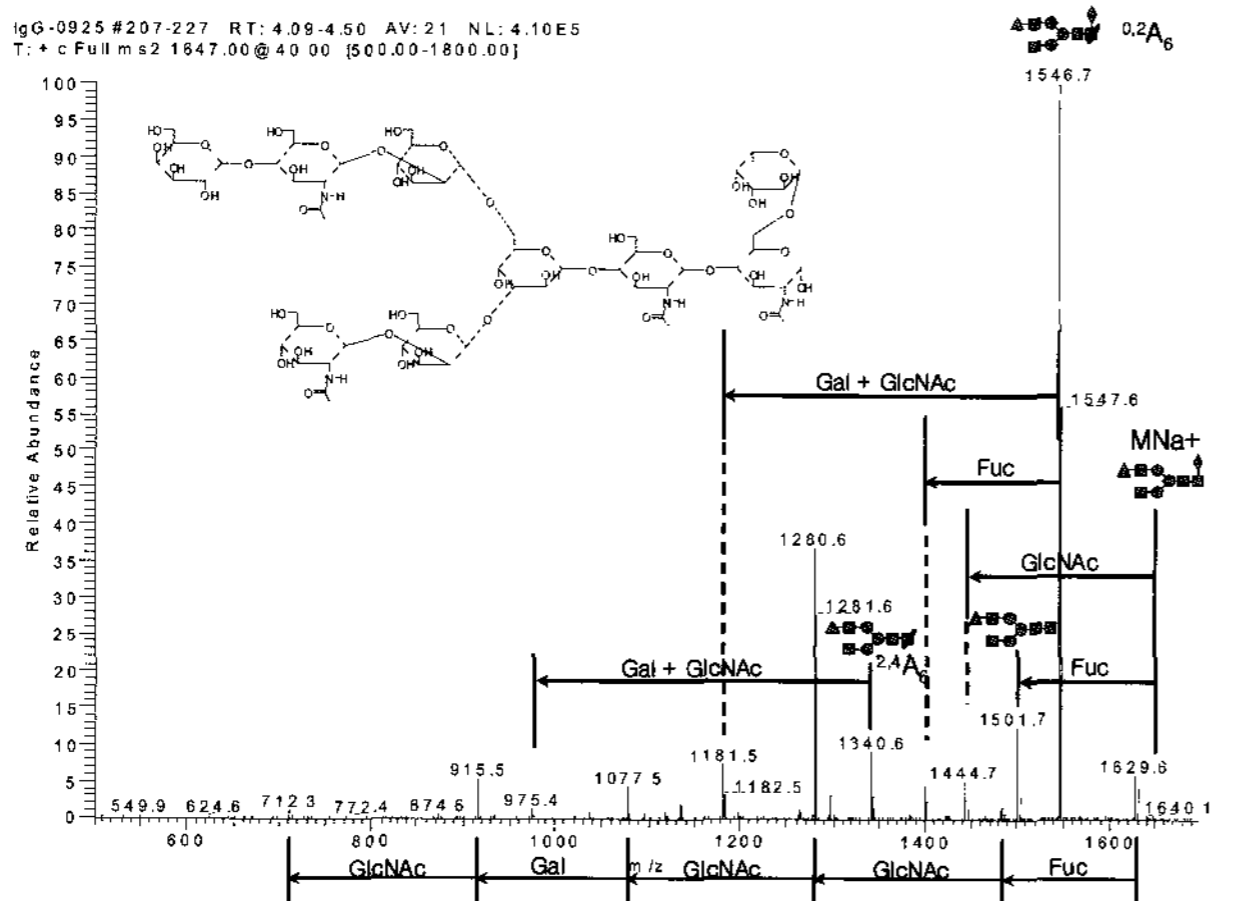


Figure 4. MS/MS spectrum and chemical structure of G1 glycan at m/z 1647.

전극 분무 이온화 질량 분석기 (ESI-MS)를 이용한 MS/MS 분석

m/z 1485, 1647, 1809 세가지 피크의 MS/MS 분석 결과 3개의 피크 모두에서 환원 말단의 푸코오스가 연결된 N-아세틸 글루코사민의 0,2 고리 쪼개짐 현상에 의한 피크가 가장 높게 관찰되었다(Fig. 3, 4, 5). 글라이칸 쪼개짐 구조의 명명은 Domon과 Costello의 명명법을 따랐다(10). 그 밖

에도 MS/MS 분석을 수행한 전구체 이온 피크와 환원 말단의 0,2 고리 쪼개짐 피크로부터 차례대로 푸코오스, N-아세틸 글루코사민이 떨어져 나오는 조각 피크들이 서로 겹치지 않고 연속적으로 나타나는 것을 세가지 MS/MS 분석 모두에서 확인할 수 있었다. 또한 비환원 말단의 갈락토오스 개수에 따라 갈락토오스가 떨어져 나와 발생하는 조각 피크들의 개수도 0, 1, 2개로 일치하였고, 특이하게도 갈락토오스가 1개인 G1의 경우만 비환원 말단의 갈락토오스와 N-아세틸 글루코사민이 동시에 떨어져 나오는 현상을 관찰할 수 있었다.

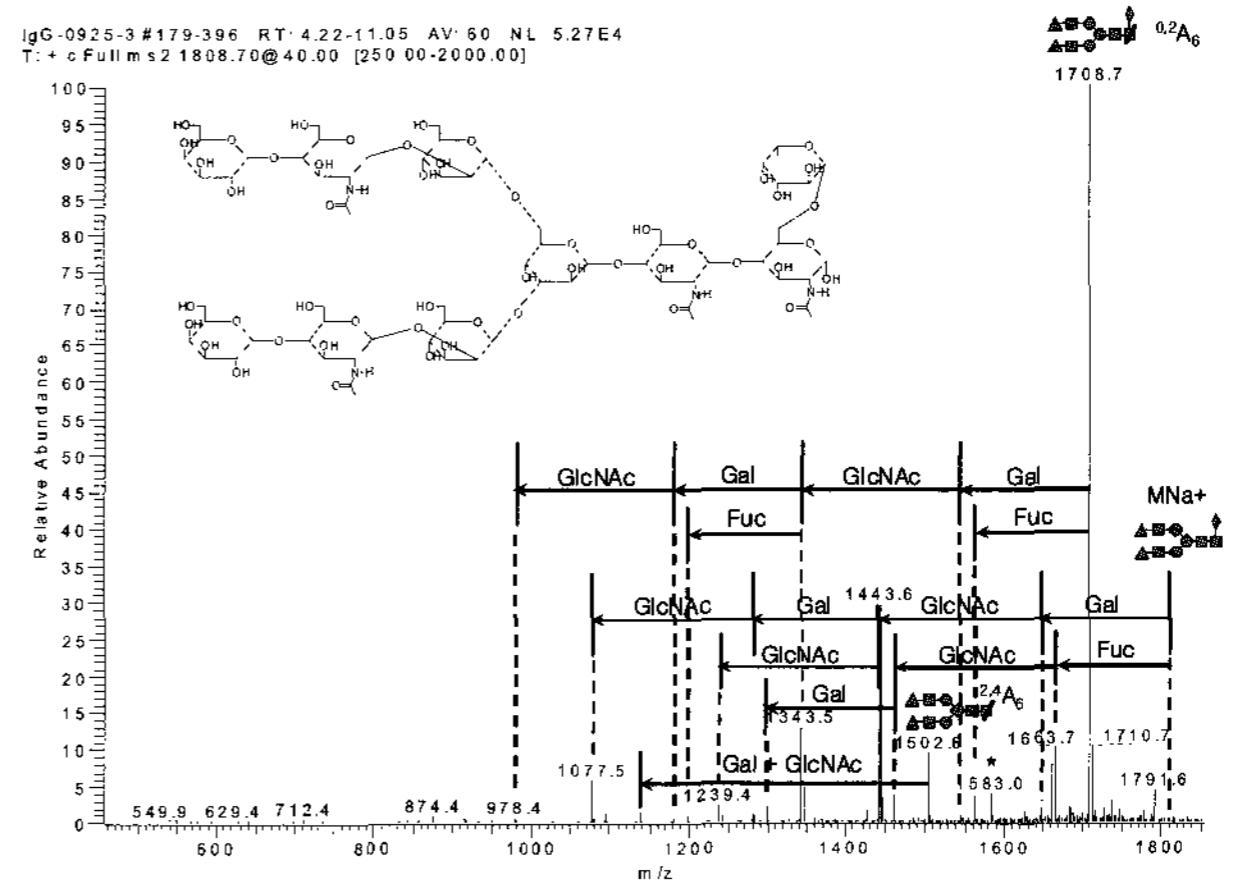


Figure 5. MS/MS spectrum and chemical structure of G2 glycan at m/z 180.

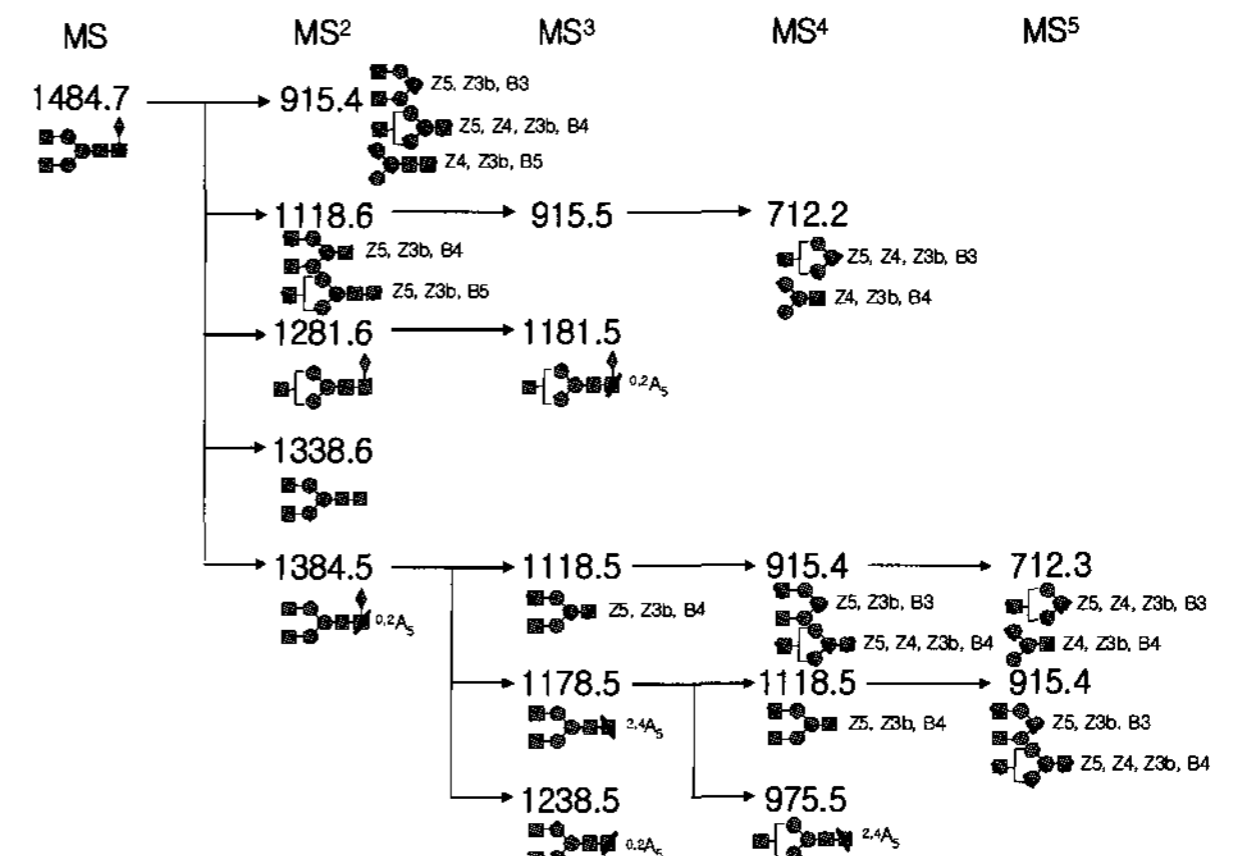


Figure 6. Tandem MS (MSn) tree of G0 glycan at m/z 1485.

다중 쪼개짐 질량 분석법을 이용한 N-글라이칸의 구조 해석

전극 분무 이온화-이온 포획 질량 분석기를 이용하여 앞서 언급했던 세가지 피크에 대해 다중 쪼개짐 질량 분석법을 수행하였고 그 결과를 트리 구조로 요약해 Fig. 6, 7, 8에 나타내었다. MS/MS 분석에서 가장 피크 세기가 컸던 만큼 0,2 고리 쪼개짐 조각 피크의 다중 쪼개짐 현상이 가장 많이 관찰될 수 있었고, 추가적인 2,4 고리 쪼개짐 현상을 관찰할 수 있었다. 특히 2,4 고리 쪼개짐 현상은 0,2 고리 쪼개짐 현상이 일어났던 가장 안쪽의 환원 말단보다 하나 바깥쪽의 N-아세틸 글루코사민에서만 일어나는 것을

볼 수 있었다. 이 밖에도 m/z 1809의 가장 큰 분자량을 갖는 G2 글라이칸의 경우 G1 글라이칸에 비해 갈락토오스의 쪼개짐이나 떨어짐 현상이 덜 관찰되는 것을 볼 수 있었으며, G0에 비해서도 만노오스의 쪼개짐 현상이 적게 관찰되었다. 이는 m/z 1809 피크의 초기 MS 스펙트럼에서의 피크 세기가 가장 낮았기 때문에 충분한 조각 피크를 얻을 수 없었을 가능성과 포획하는 이온의 m/z값이 증가함에 따라 검출할 수 있는 저분자량 쪼개짐 피크들의 양이 적어지기 때문으로 생각해 볼 수 있다. 또한 초기 MS 스펙트럼에서의 피크 세기가 낮음으로 인해 이후의 다중 쪼개짐 분석에 필요한 충분한 양의 이온을 확보하지 못해, 다른 두 글라이칸이 MS5까지 분석할 수 있었던 데 반해 m/z 1809 피크는 MS4까지만 분석할 수 있었다.

세 가지 글라이칸 피크의 다중 쪼개짐 트리 구조를 통해 MS/MS로 유추한 조각 피크들의 구조를 보다 정확하게 확인할 수 있었고, 비환원 말단의 갈락토오스 개수에 따라 상이한 다중 쪼개짐 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 질량 분석기를 이용한 보다 복잡한 구조의 글라이칸의 구조 해석에 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 전극분무 이온화-이온 포획 질량 분석기를 이용하여 인체 IgG의 N-연결 글라이칸 중 이중축각 구조를 가지면서 비환원 말단의 갈락토오스 개수가 0, 1, 2개인 서로 다른 세 가지 글라이칸의 단일 쪼개짐 (MS/MS) 및 다중 쪼개짐 현상을 관찰하고 이를 구조 분석에 이용하였다. MS/MS 분석에서는 푸코오스가 결합된 환원 말단의 N-아세틸 글루코사민의 0,2-고리 쪼개짐으로 파생되는 조각 피크가 가장 높은 세기로 나타나는 것을 관찰할 수 있었고, 전구체 피크와 별개로 연속적인 당 단위체의 쪼개짐이 일어나는 것을 알 수 있었다. 또한 G1 글라이칸의 경우에서만 비환원 말단의 갈락토오스와 N-아세틸글루코사민이 결합된 채 쪼개지는 현상이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 다중 쪼개짐 질량 분석 기법을 이용하여 MS/MS 스펙트럼에서 나타나는 조각 피크들의 구조를 재 확인할 수 있었고, 이를 트리 구조로 정리할 수 있었다. 또한 추가적인 2,4-고리 쪼개짐 현상이 환원 말단 하나 바깥쪽의 N-아세틸 글루코사민에서 공통적으로 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 다중 쪼개짐 질량 분석 기법을 이용하여 보다 복잡한 구조의 글라이칸 구조 분석에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 과학기술부 한국과학재단 (No. R01-2006-000-10234-0)과 농촌진흥청 BioGreen 21 프로그램 (20050410-034-682-149-03-00)의 지원을 받아 수행하였기에, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Clamp, J. R. and F. W. Putnam (1996), The carbohydrate prosthetic group of human gamma-globulin, *J. Biol. Chem.* **271**, 3233-3240.
2. Parekh, R. B., R. A. Dwek, B. J. Sutton, D. L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T. W. Rademacher, T. Mizuochi, T. Taniguchi, K. Matsuta, F. Takeuchi, Y. Nagano, T. Miyamoto, and A. Kobata (1985), Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG, *Nature* **316**, 452-457.
3. Wormald, M. R., P. M. Rudd, D. J. Harvey, S. C. Chang, I. G. Scragg, and R. A. Dwek (1997), Variations in Oligosaccharide-Protein Interactions in Immunoglobulin G Determine the Site-Specific Glycosylation Profiles and Modulate the Dynamic Motion of the Fc Oligosaccharides, *Biochemistry* **36**, 1370-1380.
4. Kuster, B., Naven, T. J., and D. J. Harvey (1996), Rapid approach for sequencing neutral oligosaccharides by exoglycosidase digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* **31**, 1131-1140.
5. Kuster, B., Wheeler, S. F., Hunter, A. P., Dwek, R. A., and D. J. Harvey (1997), Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* **22**, 82-101.

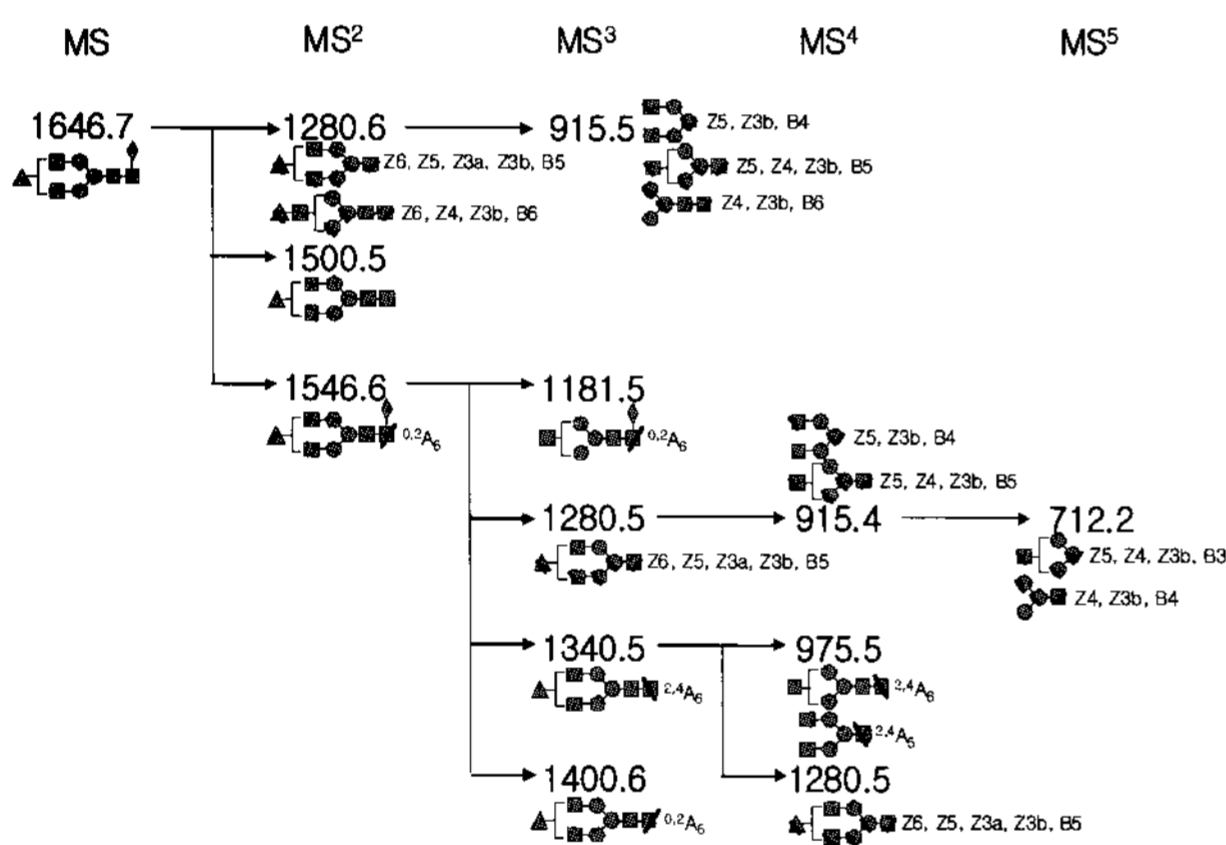


Figure 7. Tandem MS (MSn) tree of G1 glycan at m/z 164.

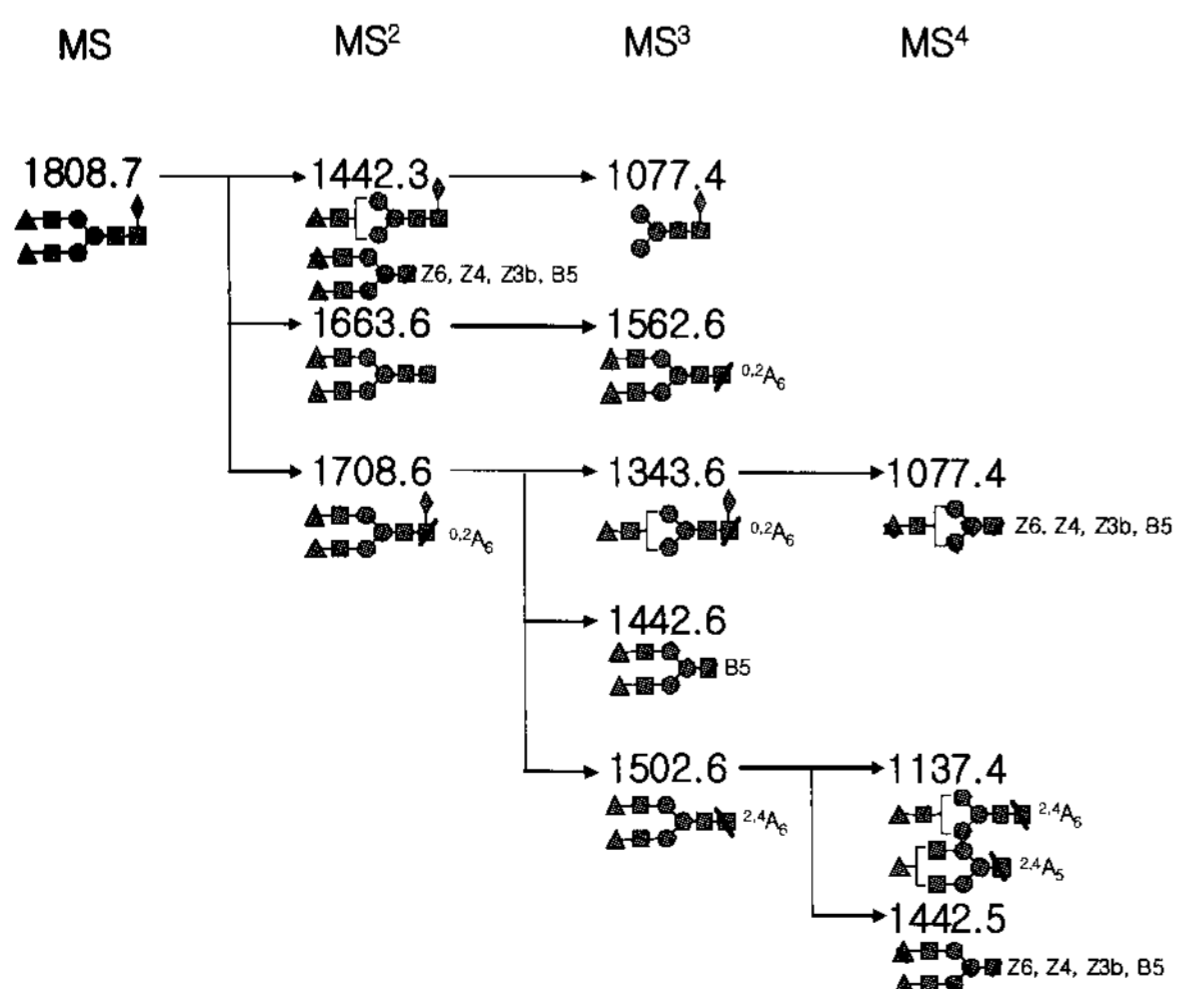


Figure 8. Tandem MS (MSn) tree of G2 glycan at m/z 1809.

6. Saba, J. A., Kunkel, J. P., Jan, D. C., Ens, W. E., Standing, K. G., Butler, M., Jamieson, J. C., and H. Perreault (2002), A study of immunoglobulin G glycosylation in monoclonal and polyclonal species by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Biochem.* **305**, 16-31.
7. Harvey, D. J. (2001), Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry, *Proteomics* **1**, 311-328.
8. Lee, C. S., Kim, Y. G., Joo, H. S., and B. G. Kim (2004), Structural analysis of lipid A from *Escherichia coli* O157 : H7 : K- using thin-layer chromatography and ion-trap mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* **39**, 514-525.
9. Creaser, C. S., Reynolds, J. C., and D. J. Harvey (2002), Structural analysis of oligosaccharides by atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionisation quadrupole ion trap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **16**, 176-184.
10. Domon, B. and C. E. Costello (1988), A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate* **5**, 397-409.