생체 고분자 구조를 연구한다 ‥ '고분해능 질량분석기'

글 | 소헌영 _ 한국표준과학연구원 책임연구원 hys@kriss.re.kr

FT-ICR MS의 성능을 가장 잘 활용할 수 있는 연구분야가 최근 각광을 받고 있는 프로테오믹스이다. 프로테오믹스는 DNA 유전정보와 세포의 기능을 단백질 수준에서 이해하려는 새로운 분야이다. '프로테오믹스' 라는 단어가 1995년에 'Electrophoresis' 지와 'Biotechnology for Genetical Engineering Review' 지에 처음 소개되었을 때는 젤을 이용한 단백질의 분리와 분석이 일반적이었지만 세포내에 많은 종류와 수가 혼합되어 있는 단백질 연구에 젤을 이용한 분리와 분석은 역부족이었다. 시료의 복잡성과 분리검출의 감도가 높은 기술을 필요로 하는 프로테오믹스 분야의 연구자들은 질량분석이 훌륭한 수단임을 알게 되었다. ESI과 MALDI의 발견으로 질량분석은 더욱 손쉽고 빠르며 정확하게 단백질과 펩타이드를 분석할 수 있는 수단이 됐다. 그 결과로 두 질량분석학자가 2002년 노벨상을 수상하기도 했다.

인택트 단백질의 PMT 정보까지도 얻어

1990년대 초, 단백질 분해 효소를 이용하여 단백질을 가수분해해서 얻어진 펩타이드 조각들을 질량분석기를 이용해 질량 정보를 얻은 후 유전자 서열로부터 유출된 단백질 서열의 데이터베이스와 비교하여 단백질의 동정을 하는 방법인 '상향식 방식' 이 발표되면서 질량 분석기를 이용한 단백질 연구는 프로테오믹스의 주요 분야가 되었다. 여러 가지 분리방법의 조합과 MS/MS를 기본으로 하는 MudPIT가 상향식 방식 접근의 가장 좋은 예라고 할 수 있다.

그러나 크로마토그래피와 온라인으로 연결된 MS/MS 기술은 펩타이드를 하나씩 선택하기 때문에 MS/MS를 거치지 않고 빠져나가는 펩타이드가 있을 수 있다. 미국의 스미스 그룹은 기존의 '상향식 방식' 에 사용해 왔던 LC-MS/MS로 시료를 분석하고 이 정보를 기초로 PMT라는 데이터베이스를 구축했다. 그리고 LC의 머무름 시간 값도 데이터베이스화하여 함께 활용함으로써 펩타이드 동정의 속도와 정확도를 향상시켰다. 이러한 기술을 AMT 태그 접근법이라 한다.

PMT에 대한 정보를 얻기에는 부족한 면이 있었던 상향식 프로테오믹스의 단점을 보완하기 위한 새로운 접근법인 하향식 프로테오믹스 방법은 질량분석기를 이용해서 온전한 단백질의 PMT에 관한 정보까지도 제공할 수 있다. 이 방법은 먼저 온전한 단백질의 정확한 분자량을 측정하고, 이를 선택적으로 기체상에서 불활성 가스와 충돌시키는 CID, 전자포획분해(ECD), 또는 IRMPD를 이용하여 단백질을 분해해서 그 조각들의 분자량으로부터 펩타이드를 동정하거나 PMT 위치와 종류를 찾는 방법이다. 이를 위해서는 온전한 단백질의 분자량이나, 조각난 펩타이드의 분자량을 정확하게 측정하는 것이 매우 중요하다. 여기에는 100만의 분해능과 1ppm 이하의 질량측정 정확성을 갖는 FT-ICR MS를 이용할 경우 PMT에 관한 많은 정보를 얻을 수 있게 된다.

한국표준과학연구원에 설치된 12 Tesla 자장의 ESI FT-ICR MS

작은 분자량 갖는 물질 분석 연구에도 효과적

FT-ICR MS의 훌륭한 분해능과 질량측정 정확성은 단백질과 같이 분자량이 큰 물질뿐만 아니라 대사체 연구와 같은 작은 분자량을 갖는 물질의 분석 연구에도 효과적이다. 관심 있는 작은 분자량의 물질들은 보통 여러 가지 혼합물 매트릭스 안에 존재하기 때문에 이를 선택적으로 정확하게 측정해야 하고, 또한 상대적인 신호의 비도 측정할 수 있어야 한다. 이를 위하여 FT-ICR MS의 장점을 활용할 수 있다. 대상물질의 정확한 분자량을 측정하여 그 물질의 원소 조성을 파악하고, MS/MS로 분해 패턴을 파악해 대상물질의 구조를 파악할 수 있다. 또한, FT-ICR MS는 유기금속 물질의 경우에도 금속의 동위원소 존재비로부터 그들의 존재와 산화 상태까지도 보여주기 때문에 이 분야에서의 활용도는 앞으로 더욱 높아질 것이다.

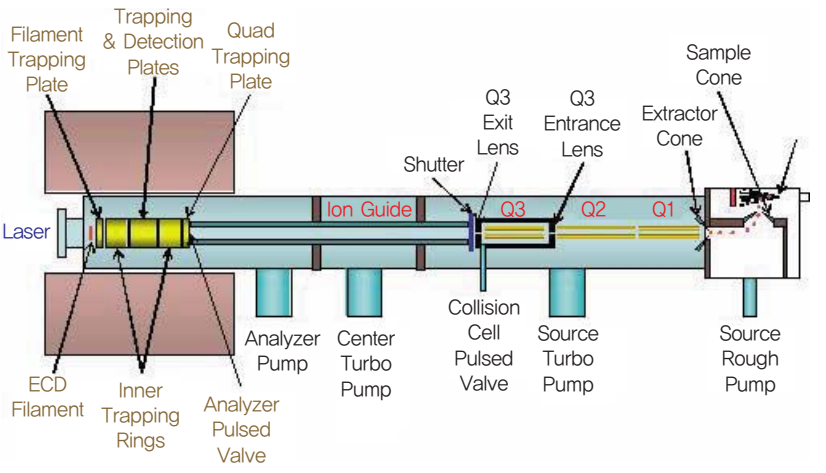
질량분석의 분해능, 질량분석 정확도, 감도 등의 한계를 극복하기 위해 선진연구 그룹들은 현재까지 출현한 질량분석기 중에서 분해능과 질량측정정확도가 가장 우수한 후리에변환 질량분석기(FT-ICR MS, Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry)를 도입하여 생체고분자의 구조 연구의 속도와 효율성을 높이는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 장비가 100만 달러 이상의 고가이고 관련 기술을 확보한 전문가가 필요하다보니 국내의 프로테옴 연구실이 독자적으로 구입해 운영하기에는 여러 가지 어려움이 있었다.

한국표준과학원은 국내의 단백질 및 유전자 연구를 위하여 FT ICR MS 중 세계에서 상업적으로 가장 고성능인 12테슬라(Tesla)의 초전도 자석을 이용해 제작된 장비를 도입해 운영하고 있다. 이러한 최첨단의 질량분석 기술은 국내에서 거대 생체고분자의 구조를 연구하는 연구자들에게 새로운 연구의 툴을 제공하고 있다.

후리에변환 방식 이용, 사이클로트론공명 주파수 측정

균일한 자장 B안에 움직이는 이온이 원운동을 하는 것을 이온 사이클로트론운동(ICR)이라 한다. 이온 사이클로트론 운동방정식에 따르면 질량 대 전하 비(m/z)를 갖는 이온은 초기속도와 무관하게 똑같은 ICR 주파수를 갖는다. 정밀한 m/z의 측정을 위해서 다른 원리를 이용하는 질량분석기처럼 이온들이 균일한 운동에너지를 갖도록 할 필요가 없는 것이 장점이다. 이러한 물리학적인 특징 덕분에 ICR는 매우 우수한 질량분석기가 된다.

FT-ICR MS는 ICR 셀에서 이온들이 운동하는 사이클로트론 주파수를 측정하여 그 이온들의 질량을 측정한다. 후리에변환 방식에서는 주파수의 함수로 천천히 스캔하는 방법 대신에 궤적운동을 하는 이온들이 금속성 검출기 판에 유도하는 유도전류를 시간의 함수로 기록하여 이온들의 진동함수의 혼합 신호를 얻고 이 신호를 후리에변환하여 각 이온들의 사이클로트론공명 주파수를 알아낸다.



12 Tesla ESI FT-ICR MS의 이온 경로를 보여 주는 내부 구조

그 시간영역의 데이터를 후리에변환하면 한번에 모든 사이클로트론 주파수를 얻게 되어 약 1만 배 이상의 빠른 시간신호를 얻는 이득이 있다.

자장 세기 11.9854T, 질량측정 정확도 1ppm 이하

한국표준과학연구원은 12T FT-ICR MS 2기와 이 장비의 운영 효율을 극대화하기 위해 나노 LC, 모세관전기영동기, MALDI 시료준비자동화기, 다채널 ESI 장치, MALDI 자동시료준비기 등의 부대장비를 갖추고 있으며, 단백질 시료 데이터의 처리를 위한 자체적인 DB 및 검색엔진 시스템을 구축하고 있다. 2005년 1월에 도입된 FT-ICR MS 1호기는 ESI 이온화 장치가 장착되어 있으며 모세관 액체크로마토그래프와 연결해 사용하거나 단백질 자체를 가수분해 없이 직접 분석하는 탑다운 방식의 프로테옴 분석에 활용할 예정이다.

FT-ICR MS 1호기의 초전도자석은 자장의 세기가 11.9854T이며, 자장균질도는 ±1.5ppm이고, 시간당 자장변화는 0.0015ppm 이하다. FT-ICR MS의 본체는 이온의 선택, 이온축적, 이온의 충돌 분해 등이 가능한 세쌍의 사중극자 매스 필터와 이온을 ICR 셀에 주입하기 위한 사중극자 이온 가이드 등으로 이루어진 이온도입부가 있다. 질량측정정확도는 내부 보정을 사용하면 1ppm 이하이고 외부 보정을 사용하면 5ppm 이하다. 질량분해능은 ESI 조건에서 유비퀴틴의 m/z 857 이온의 경우 분해능 110만 이상을 얻었다. 감도는 ESI조건에서 유비퀴틴을 50fmol 소비할 때 m/z 780 피크의 S/N 비가 10:1이었다. LC/MS 측정 속도는 1초당 1번의 측정이 가능하고, ICR 셀내에서 MS/MS 기능을 수행한다. 셀내에서 ECD, IRMPD, CID 등의 방법이 가능하다.

올 해 안에 도입될 예정인 2호기는 이온원으로 MALDI가 장착된다. 기본 성능 및 사양은 1호기와 동일하며 국내에 보급된 보통의 시료 플레이트를 직접 사용할 수 있도록 설계되었다. 따라서 국내 단백질체 연구실들과 공동 연구 수행에 편리하게 사용할 수 있을 것이며 질량측정의 정확도가 높은 특성을 활용함으로써 그 동안 분해능이 낮은 질량분석기에서 해결하지 못한 단백질 동정 문제를 해결할 수 있을 것이다.

현재 12T FT-ICR 질량분석기의 성능을 최대한 살릴 수 있도록 생물학 연구자와의 공동연구가 시범적으로 진행되고 있다. 시범적인 공동연구는 기기의 성능을 최대한 살릴 수 있는 연구분야를 발굴하고 기기의 공동활용 및 생물학 연구자와의 공동연구를 효과적으로 진행할 수 있는 체계를 구축할 것이다. 현재 진행되고 있는 제한적인 공동활용연구의 경험을 바탕으로 2기의 고자장 FT-ICR 질량분석기 도입이 완료되는 올 연말에는 생물학자를 포함한 사용자 운영위원회를 구성, 기기의 공동활용 전략 및 절차를 마련하고 본격적인 공동활용연구를 시작할 예정이다. ST

글쓴이는 서울대학교에서 석사 학위를 받았다. 미국 국립고자장연구소 방문교수를 지냈다.