

# 단백질의 메탈 킬레이션 화합물 제조 및 확인에 관한 연구

김성호<sup>1\*</sup>, 남해선<sup>2</sup>, 이윤진<sup>1</sup>

## The study for the synthesis and analysis of metal chelated protein

Sung-Ho Kim<sup>1\*</sup>, Hae-Seon Nam<sup>2</sup> and Yoon-Jin Lee<sup>1</sup>

**요 약** 생체내에 존재하는 효소 등의 단백질은 그 골격을 이루는 아미노산 이외에 다양한 형태로 금속 원소들과 킬레이션을 이루고, 고유한 생리활성을 나타낸다. 단백질과 금속과의 킬레이션을 체계적으로 연구하기 위하여 가수분해하여 얻은 펩타이드와 Zn(II) 이온을 반응시키고, MALDI-TOF 질량분석기로 킬레이트 반응 전 후의 펩타이드의 분자량을 측정하여 킬레이트 반응 생성물을 확인하는 분석법을 개발하고자 한다.

**Abstract** In living system, various types of metal chelated protein show their intrinsic biological activities. In order to investigate the chelation reaction between protein and metal, zinc chelated peptide was synthesized by the peptide, hydrolyzed protein, with zinc. And simple analytical method for the chelation reaction was developed using MALDI-TOF mass spectrometry.

**Key Words** : chelation, zinc, MALDI-TOF

### 1. 서론

단백질은 생체 구성성분으로 가장 많이 필요하며, 식물이나 육류에 풍부하게 함유하고 있는 물질로 생체내에서 다시 이용하기 위해서는 소화기관에서 아미노산과 올리고펩타이드로 분해하여 이들을 소장에서 흡수시키고, 필요한 조직에서 자신의 구성성분에 맞는 물질로 재합성 과정을 거쳐야만 생체내 구성 성분이 된다. 그리고 단백질은 메탈 이온과 킬레이트 화합물을 이루며, 킬레이트 메탈 화합물은 생체내에 존재하는 상태의 광물질과 구조와 기능이 유사하기 때문에 자연 상태에 존재하는 각종 형태의 메탈 이온보다 장내 흡수율을 3-4배 이상 향상시킨다. 특히 체내의 각종 대사작용과 효소체계, 면역체계에 메탈 이온이 관여하기 때문에 킬레이트 메탈 이온에 대한 관심은 매우 크다. 킬레이트 화합물은 메탈 이온과 직접적인 화학반응이 불가능하고 펩타이드 된 단백질의 결사슬과 배위공유결합된 것으로 킬레이트 된 메탈 이온과 펩타이드 각각의 성분 기능을 발휘하는 것이 아

니라 킬레이트 화합물 전체로서의 성질을 갖는 것을 말한다. Complex 상태의 화학결합 물질은 안정성이 높는데 이 안정성은 킬레이트 결합속의 금속이 소화과정에서 우리가 바라지 않는 화학반응에 휘말려 들어가는 것을 방지시킨다. 즉 킬레이트 메탈은 아미노산이나 디펩타이드(dipeptide)가 흡수되는 경로를 따라 장점막 세포로 곧바로 흡수되어 체내효소활성화에 의한 생리기능 향상, 면역기능을 개선해주기 때문에 의약품, 사료 등의 용도로 사용될 뿐 아니라 항균작용도 있어 세정제, 항균제로도 사용되는 등 용도가 다양하다.

Zn(II) 이온은 금속원소로 생체를 구성하는 주요 원소의 하나로 탈수소산소, DNA, 폴리메아제 등의 효소와 관련하여 유전자발현, 단백질 합성 같은 생체반응에 영향을 주는 필수적인 미량원소이다. 1869년 Raulin은 Zn(II) 이온이 *Aspergillus niger*의 성장을 위하여 필수적인 성분임을 보고하였다<sup>1,2)</sup>. 그 후 1926년 고등식물에 필수요소임이 밝혀졌고, 1934년 Todd, Elvehjem, Hart 등에 의하여 쥐의 성장에 필수요소임이 보고되었다. 특히 1940년 Keilin과 Mann이 Carbonic anhydrase를 분리하여 확인한 결과 구성요소로서 Zn(II) 이온을 함유하고 있으며 이 효소의 기능에 Zn(II) 이온이 필수적임을 발견한 이래로 생체내 기능이 밝혀지기 시작했다. 사람에게서도 Zn(II) 이온 결핍증이 나타날 수 있음이 1961년 처음으로 의심되

이 논문은 2005년 순천향대학교 교내연구비의 지원에 의해 연구되었음

<sup>1</sup>순천향대학교 자연과학대학 화학과

<sup>2</sup>순천향대학교 의료과학대학 의예과

\*교신저자 : 김성호(shkim71@sch.ac.kr)

기 시작하였고 1969년 중동지역 주민들에게서 발생한 아연(II) 이온 결핍증세가 보고되기 시작했다<sup>3)</sup>. 그 이후 Zn(II) 이온은 모든 식물과 동물조직 속에 존재한다는 사실이 밝혀졌으며 동물조직속의 Zn(II) 이온의 농도는 Cu 이나 Mg 보다 높고 Fe과는 거의 비슷한 정도로서 필수영양소로 등장되었으며, 최근 효소 기능에 있어 Zn(II) 이온의 역할, 핵산대사, 단백질 대사 및 세포분열과 zinc와의 관계, 세포막에 대한 Zn(II) 이온의 기능, 생체 내 면역기능과 Zn(II) 이온과의 관계에 중점을 두어 연구되고 있다<sup>4,5)</sup>. Zn(II) 이온의 잘 알려진 기능은 모든 식물과 동물조직에 존재하면서 식물성 단백질의 체내이용률을 높이고, 인체의 성장과 면역기능을 원활히 하며, 상처회복을 촉진, 단백질 대사에 관여하는 carboxypeptidase, glutamic dehydrogenase 등의 구성성분으로 여러 생리적 기능을 나타낸다<sup>6)</sup>. 결핍되는 경우 혈장 내 총 단백질의 양을 감소시키며, 성장이나 근육발달이 지연되고 생식기 발달이 저하되며 식욕부진 및 미각과 후각의 감퇴 등이 나타난다. 반면 과도한 공급은 독성을 유발하므로 체내에서 Zn(II) 이온을 적정농도로 유지시켜야 한다.

아미노산이나 펩타이드가 Zn(II) 이온, Cu 등의 메탈 이온과 킬레이트(metal-peptide chelate)를 이룰 때는 메탈 이온의 3d 오비탈에 펩타이드(또는 아미노산)의 O, N의 비공유전자쌍을 일반적으로 메탈 이온에 제공하여 coordination compound를 형성하기 때문에 메탈 이온과 펩타이드(또는 아미노산)가 몰비로 1 : 2의 킬레이트 화합물을 그림 1과 같이 형성하는 것으로 보고되어 있다. 다양한 종류의 아미노산과 메탈 이온 Cu, Ca, Zn(II) 이온 등이 결합한 아미노산 메탈과, 이보다는 분자량이 큰 펩타이드와 메탈 이온이 킬레이트를 이룬 펩타이드 메탈 등 여러 가지 형태의 유기태 메탈이 제조 시판되고 있으나, 어떤 제품이 가장 효율성이 높고 생체 내에서 효과가 있는 것인지에 대한 이해 및 확인이 요구된다. 질량분석법은 이전의 전통적인 분석법에 비해 단백질 등과 같은 생고분자 물질(biopolymer)에 대해 매우 정확한 분자량 값을 제공한다. 특히 1980년대 후반부터 개발된 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 시간 비행(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; MALDI-TOF) 질량분석법은 수백에서 수백만 Da의 단백질 질량측정이 가능하다. 특히 수천 Da 범위에서는 0.1Da 이내의 높은 정확도, 분석의 신속성, 반복성, 간편성을 장점으로 갖고 있다. 측정하려는 시료의 물리적 상태나, 매트릭스(matrix)의 선정, 시료와 혼합된 매트릭스의 결정상태, 레이저의 세기, 가속전압 등 기기의 조건에 따라 대상 시료의 분자량 측정여부가 결정된다.

본 연구에서는 MALDI-TOF 질량분석기로 킬레이트

반응 전 후의 펩타이드의 분자량을 확인하고, 이를 통해 킬레이트 반응 생성물을 확인하는 분석법을 개발하고자 한다.

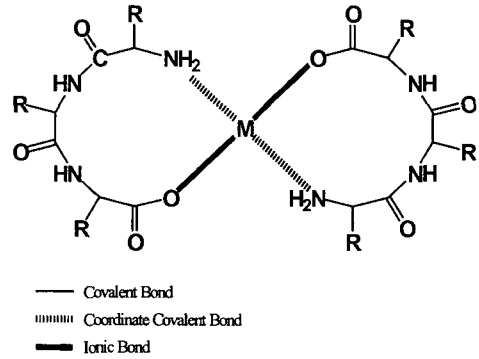


그림 1. 메탈 펩타이드 킬레이트(Metal-peptide chelate)의 구조

## 2. 실험방법

### 2.1 펩타이드 제조

케라틴 20g에 1N NaOH 용액 400ml을 넣고 37°C에서 24시간동안 반응시켜 케라틴을 가수분해하였다. 분해반응 진행 도중 1, 4, 7, 13, 19, 24시간 경과 시 분석시료를 채취하였다.

### 2.2 케라틴 fragment의 Zn-킬레이션

가수분해된 케라틴 fragment에 황산아연 1수염 (ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 24g을 넣고 20분간 37°C를 유지하면서 교반하였다. 여기에 50% NaOH 9g을 넣고 20분간 교반시켜 펩타이드를 아연 염과 반응시켜 메탈 펩타이드 킬레이트를 형성시켰다.

### 2.3 시료의 전처리

2.1과 2.2에서 생성된 펩타이드 또는 메탈 펩타이드 킬레이트 시료에 완충용액이나 0.1N의 염산(또는 질산)을 이용하여 pH를 3.5로 유지시켰다. 이 용액을 0-4°C의 저온을 유지시키면서, 4500rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 제거하였다. 불순물을 제거하기 위해 증류수를 가하고 원심분리한 후, 펠렛(고형분)을 아세톤 등의 유기용매에 녹인 후 다시 원심분리하는 세척 과정을 2-3회 반복하였다. 남아있는 고형분을 0°C 이하에서, e-tube에 시료를 20μl 취해서 RVT400 냉동 기체포집기와 VLP120 진공펌프가 부착된 SpeedVac Plus를 이용해 50torr의 저

진공을 유지하며 5시간 건조시켰다. 이 시료에 3차 증류수 20 $\mu$ l를 가한 후 충분히 섞어주어 용해시켜 시료용액을 제조하였다.

### 2.4 시료 매트릭스 혼합용액 제조

MALDI 측정시 매트릭스는 SA(3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며, 용매는 0.5% TFA(Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, USA)/50% ACN(ACS/HPLC Grade; Burdick & Jackson, Muskegon, MI, USA)를 사용하였다. SA(3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 1mg을 0.5% TFA(Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, USA)/50% ACN(ACS/HPLC Grade; Burdick & Jackson, Muskegon, MI, USA)에 녹여서 만들었다. 이때 실제 시료와 함께 혼합하는 데 사용한 매트릭스 용액의 양은 총 30 $\mu$ l이었다. 즉, MALDI 측정시 최적의 매트릭스 결정 형성을 위해 제조된 시료용액 1 $\mu$ l당 매트릭스 용액 30 $\mu$ l를 혼합하였으며, 이 용액중 2 $\mu$ l를 MALDI plate에 한방울씩 로딩하였다.

### 2.5 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF는 Applied biosystem사의 4700 프로테오믹스 분석기(Proteomics Analyzer)를 사용하였으며, 측정시 가속전압은 20kV, 격자전압은 72%, 지연시간은 150이었고, 총 2000회의 레이저 주사를 통해 스펙트럼을 얻었다.

MALDI-TOF MS 분석시 700Da 이하에서는 매트릭스에 의한 피크가 매우 커 실제 단백질의 피크가 잘 확인되지 않으므로 m/z 700-3000의 범위에서 분자량을 확인하였다.

## 3. 실험 결과 및 고찰

### 3.1 가수분해된 케라틴 펩타이드의 분자량 측정

케라틴을 가수분해한 시료의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 그림 2에 나타내었다. 케라틴은 584, 696, 920, 965, 1107, 1130, 1570, 1889, 1958, 1976, 2063 및 2221Da의 분자량을 갖는 펩타이드로 가수 분해된 것을 확인하였다. 확인된 펩타이드 조각의 상대적 세기를 고려해 볼 때 평균적으로 분자량 600 - 2000 Da 정도의 펩타이드가 가수분해되어 생성되었음을 알 수 있었다.

가수분해된 케라틴의 MALDI-TOF 질량분석 스펙트럼을 얻기 위한 시료의 전처리 과정의 효과를 그림 3에

나타내었다. 시료의 전처리 과정을 거친 경우 다양한 가수분해된 펩타이드의 조각이 발견된 반면, 전처리 과정을 적용하지 않은 경우에는 확인되는 피크(peak)의 갯수와 세기가 매우 감소하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 시료의 전처리 과정의 적용은 MALDI-TOF 질량분석 측정시 다양한 펩타이드 조각의 확인이 가능함을 알 수 있었다.

MALDI-TOF 질량분석 측정시 매트릭스로  $\alpha$ -CHCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)와 SA를 사용하였을 때의 질량분석 스펙트럼을 비교한 결과를 그림 4에 나타내었다. 매트릭스로서  $\alpha$ -CHCA를 사용한 경우 m/z 666 에서 발견되는 큰 피크 이외에는 펩타이드 조각의 피크가 발견되지 않은데 비해, SA를 사용한 경우 12개의 펩타이드 조각이 확인되었다. 따라서, 가수분해된 케라틴 펩타이드의 분석에 있어 매트릭스로서 SA가 바람직함을 확인할 수 있었다.

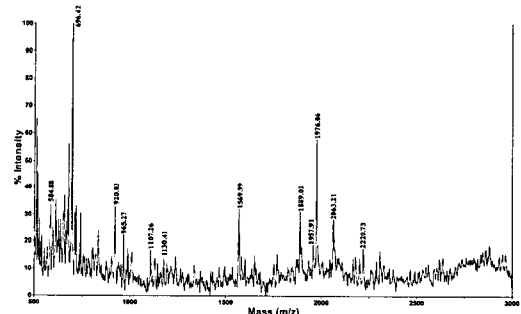


그림 2. 가수분해된 케라틴의 MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) 질량분석 스펙트럼

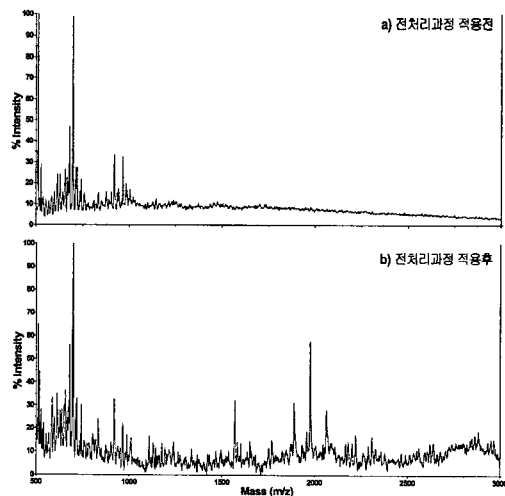


그림 3. 시료의 전처리 과정 전후의 가수분해된 케라틴의 MALDI-TOF 질량분석 스펙트럼  
a) 전처리과정 적용전 b) 전처리과정 적용후

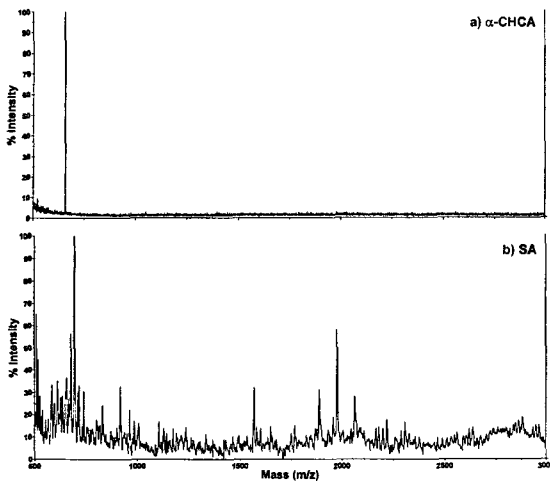


그림 4. 매트릭스로  $\alpha$ -CHCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)와 SA(3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid)를 사용하였을 때 각각의 가수분해된 케라틴의 MALDI-TOF 질량분석 스펙트럼  
a)  $\alpha$ -CHCA b) SA

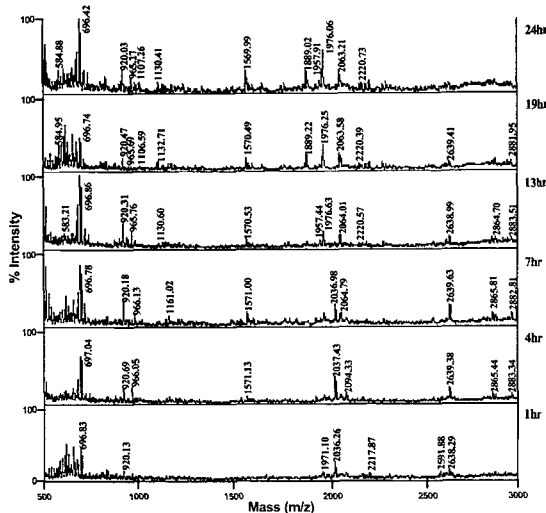


그림 5. 반응 시간에 따른 가수분해 단백질의 MALDI-TOF MS 스펙트럼의 변화

### 3.2 가수분해 반응시간별 펩타이드 조각의 시간별 변화

가수분해 반응시간에 따른 케라틴의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼 변화를 그림 5에 나타내었다. 가수분해 1시간 후 분자량 696.83, 920.13, 1971.10, 2036.26, 2217.87, 2591.88 및 2638.29 Da의 펩타이드가 확인되었으며, 1시간 이후 반응시간 증가에 따라 스펙트럼상의 변화가 관찰되었다. 가수분해반응의 시간이 증가함에 따라 분자량

696.83, 920.13 및 1971.10Da에서 발견되는 피크들은 그 세기가 증가하는 반면, 분자량 2036.26, 2217.87, 2591.88 및 2638.29Da에서 발견되는 피크들은 반응시간에 따라 점점 감소하며 사라지는 것을 볼 수 있었다. 또한 24시간 동안 반응시킨 결과를 기준으로 볼 때, 분자량 584.88, 965.27, 1106.59, 1130.41, 1569.99, 1889.02, 2063.21 및 2220.73Da에서 1시간 반응시킨 시료에서는 관찰할 수 없었던 새로운 펩타이드 조각이 확인되는 것을 볼 수 있었다. 반응시간의 증가에 대한 질량분석 스펙트럼의 변화를 볼 때, 13시간의 반응시간 이후에는 거의 변화가 없었으므로, 13시간 이상의 가수분해 과정을 거치면 케라틴에서의 가능한 가수분해 과정은 모두 완료됨을 확인할 수 있었다.

### 3.3 펩타이드 메탈 킬레이트의 분자량 확인

가수분해시킨 케라틴 펩타이드와 Zn(II) 이온을 킬레이션 시킨 케라틴 펩타이드 킬레이트에 대한 반응전, 후의 MALDI-TOF MS 질량분석 스펙트럼 결과를 그림 6에 나타내었다.

아미노산 또는 펩타이드 분자가 메탈 이온과 킬레이트 화합물을 생성할 때에는 카르복실 말단의 양성자(H<sup>+</sup>) 하나를 잃고서 결합한다. 메탈 이온인 Zn(II) 이온과 가수분해된 펩타이드 조각이 1: 2로 반응하여 메탈 펩타이드 킬레이트를 형성하게 되면 아미노산의 카르복실기의 양성자를 잃고 결합하기 때문에, 메탈 이온과의 반응 전에 확인되는 펩타이드 조각에서 양성자 하나가 제거된 질량의 두 배와 Zn(II) 이온의 원자량(65.39 Da)과의 합에 해당하는 피크가 킬레이션 반응 후의 스펙트럼에 나타나게 된다.

Zn-펩타이드 킬레이트에 대한 스펙트럼을 분석한 결과, 분자량 1237.26Da([M+Na-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) (i)은 킬레이션 전 분자량 584.88Da (i)에 해당하는 펩타이드 두 조각과 Zn(II) 이온과의 킬레이션에 의한 메탈 킬레이션이 확인되었고, 분자량 1454.65Da([M-2H<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>) (ii)는 킬레이션 전 분자량 696.42Da (ii)에 해당하는 두 펩타이드 조각과 Zn(II) 이온과의 킬레이션에 의한 메탈 킬레이션이 확인되었다. 또한 분자량 1900.51Da([M-2H<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>) (iii)는 킬레이션 전 분자량 920.03Da (iii)에 해당하는 두 펩타이드 조각과 Zn(II) 이온과의 킬레이션에 의한 메탈 킬레이션의 결과로 확인되었고, 분자량 2327.62Da([M+Na-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) (iv)는 킬레이션 전 분자량 1130.41Da (iv)에 해당하는 펩타이드 두 조각과 Zn(II) 이온과의 킬레이션에 의한 메탈 킬레이션의 결과로서 펩타이드 조각이 Zn(II) 이온과 메탈 킬레이션 되었음을 확인할 수 있었다.



이 윤 진(Yoon-Jin Lee)

[정회원]



- 1996년 2월 : 순천향대학교 식품영양학과 (이학사)
- 1998년 2월 : 순천향대학교 식품영양학과 (이학석사)
- 2005년 2월 : 순천향대학교 식품영양학과 (이학박사)
- 2005년 3월 ~ 현재 순천향대학교 Post-Doc.

<관심분야>

질병관련 단백질 분리 기술, 천연 성분 분리 및 추출