

MALDI-TOF MS를 이용한 효모에서의 황화수소 생성 단백질의 동정

조현남 · 판루안 · 유동찬 · ¹양선아 · ¹이인선 · ²김재형 · ²백효현 · †지광환
금오공과대학교 자연과학부 응용화학전공, ¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터, ²동일시마즈(주)
(접수 : 2008. 4. 17., 게재승인 : 2008. 10. 2.)

The MALDI-TOF MS determination of yeast proteins producing H₂S

Hyun-Nam Cho, Lu-An Fan, Dong-Chan Yoo, Seun-Ah Yang¹, In-Seon Lee¹, Jae-Hyung Kim²,
Hyo-Hyun Baek², and Kwang-Hwan Jhee†

Dept. of Applied Chemistry, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 730-701, Korea
¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
²Bio Institute, Dong-il SHIMADZU Corp., Daejeon 305-340, Korea

(Received : 2008. 4. 17., Accepted : 2008. 10. 2.)

Hydrogen sulfide (H₂S) is a by-product of metabolism of amino acids including sulfur and alcoholic fermentation, it is generally thought of in terms of a poisonous gas. Though H₂S can have a negative impact on the perceived quality of fermented drinks due to an undesirable aroma, it plays prominent roles as a neuromodulator in the mammalian brain as well as a smooth muscle relaxant. Nowadays studies on the proteins which produce H₂S are carried out in various fields such as structure, function, and metabolism. Here we propose to develop a simple and rapid H₂S forming assay method, which will lead to speed up preparing the H₂S forming proteins for identification by MALDI-TOF MS analysis. We detected three kinds of proteins which produce H₂S in the crude extract of *Saccharomyces cerevisiae*. Those proteins were cystathionine β -synthase, O-acetylserine sulfhydrylase, and cystathionine γ -lyase.

Key Words : Hydrogen sulfide, cystathionine β -synthase, O-acetylserine sulfhydrylase, MALDI-TOF MS analysis

서 론

황화수소 (H₂S)는 주로 포유동물의 뇌에서, L-methionine에서 L-cysteine의 대사경로에서 cystathionine β -synthase (CBS)에 의해 L-cystathionine과 함께 생성되는 대사산물이며 비록 썩은 달걀 냄새를 내는 독성의 기체이지만, 포유동물의 뇌에서 신경조절 물질로서의 중요한 기능을 한다(1, 2). 또한 평활근의 이완제로서 기능을 하며, 포유동물의 뇌에서 황화수소의 낮은 농도와 몇몇 질병과의 연관성이 밝혀졌고, 특히 Alzheimer's disease 환자들의 뇌에서는 정상인들의 뇌에 비해서 낮은 수준의 황화수소가 발견되어지고, 이것이 병의 원인이 될 수 있다는 연구결과가 발표되면서 황화수소를 생성할 수 있는 단백질의 발견과 조절이 주목을 받고 있다(3). 특히 포유동물의 뇌에서 L-cysteine과 L-homocysteine을 기질로 하여 L-cystathionine의 합성을 촉매

하는 효소인 CBS의 활성저하로 인해 황화수소의 농도가 낮아질 수 있는 보고가 있으며(4), CBS의 활성저하는 순환기 장애의 중요한 위험인자로 작용하는 homocysteine의 혈중 농도를 높이는 원인이 되기도 한다(5, 6).

한편 황화수소에 대한 발효주 산업의 견해는 이와 다르다. 미생물의 알코올성 발효과정에서 생성되는 황화수소는 발효주 산업에 있어서 악영향을 끼친다. 효모를 이용한 발효주에서 효모의 알코올성 발효의 부산물로 생성되는 불쾌한 향인 황화수소는 발효주의 품질을 떨어지게 한다(7, 8). 이러한 이유로 발효주 산업에서는 유전학적인 접근 방법을 통하여 황화수소 생성에 관련한 단백질들을 적게 포함한 발효 균주를 선별하는 방법을 택하였다(9-11). 또는 생화학적 접근 방법을 이용하여 황화수소를 생성할 수 있는 단백질들이 발견되어지고 있고(12), 이 중 많은 연구가 진행된 효소로 유전자 CYS4가 만드는 CBS와 유전자 MET17의 산물인 O-acetylserine sulfhydrylase (OASS)가 있다(13, 14). OASS는 O-acetylserine과 hydrosulfide ions (HS⁻)로부터 cysteine합성을 촉매 하는 효소이며(15), 발효과정에서 황화수소 생성에 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 왔다(7). 현재 이들 효소간의 상보성에 관한 연구와 효소 억제에 관한 연구, 그리고 유전자 조절 또는 변이를 통한 효소의 생성자체를 차단

† Corresponding Author : Department of Applied chemistry,
Kumoh National Institute of Technology, 1 Yangho-dong, Gumi
730-710, Korea
Tel : +82-54-478-7837, Fax : +82-54-478-7710
E-mail : khjee@kumoh.ac.kr

하거나 발현되는 효소량의 감소 또는 활성을 억제하는 연구들이 활발히 진행되고 있다(16, 17).

이와 같이 의약 분야와 발효 산업에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 황화수소를 생성할 수 있는 단백질들의 동정과 선별 그리고 조절에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 단백질들의 기존의 분석방법은 2-dimensional 전기영동 분석을 통해 분리된 단백질의 spot들을 각각 MS분석을 하여 단백질들을 동정하였다. 이 분석방법은 관련 효소 외의 단백질 모두를 분석해야 하는 단점을 가지고 있다.

따라서 본 연구는 황화수소를 생성할 수 있는 단백질만을 선별하여 분석하고자 하였고, 황화수소를 생성할 수 있는 단백질의 동정에 관한 연구를 알코올성 발효에 사용되고, 인간과 상동성이 높은 효모 (*S. cerevisiae*) 기원의 단백질들을 이용하여 수행하였다(18, 19). 효모에서 황화수소를 생성할 수 있는 단백질들은 주로 보조소로서 pyridoxal 5' phosphate (PLP, 비타민 B₆)를 함유하고 있다(5). 보고된 바와 같이 보조소로 PLP를 사용하는 효소는 PLP의 화학적 특성을 이용하여 탈탄산반응, 이성질화반응, 탈아미노기반응, 다양한 전이반응을 수행하는 등 반응특이성을 보이고 있다(15). 따라서 생체에서 황화수소를 생성할 수 있는 잠재적 기질, 즉 친핵성 공격능이 강한 기질인 L-cysteine과 β -mercaptoethanol을 이용하면 β -replacement 촉매반응을 일으키고 부산물로서 황화수소를 발생 시킬 수 있다(Fig. 1). 이렇게 생성된 황화수소 기체는 Pb-acetate와 자발적인 반응을 통해 생성되는 검은 침전인 Pb-S (lead sulfide)를 형성 한다(4). 본 연구에서는 이러한 반응을 이용하여 효모에서 황화수소를 생성할 수 있는 단백질들만을 신속하고 간편하게 선별, 정제하였고, 이 단백질들을 MALDI-TOF MS 분석으로 확인하여 CBS와 OASS를 동정하였다. 또한 이와 더불어 황화수소를 생성할 수 있는 단백질 중 하나인 cystathionine γ -lyase (CYS3)도 동정되어졌다. 본 연구에서 생체 내에서 중요한 역할을 하는 황화수소를 생성할 수 있는 단백질들을 신속하고 정확하게 동정하는 방법을 보고한다.

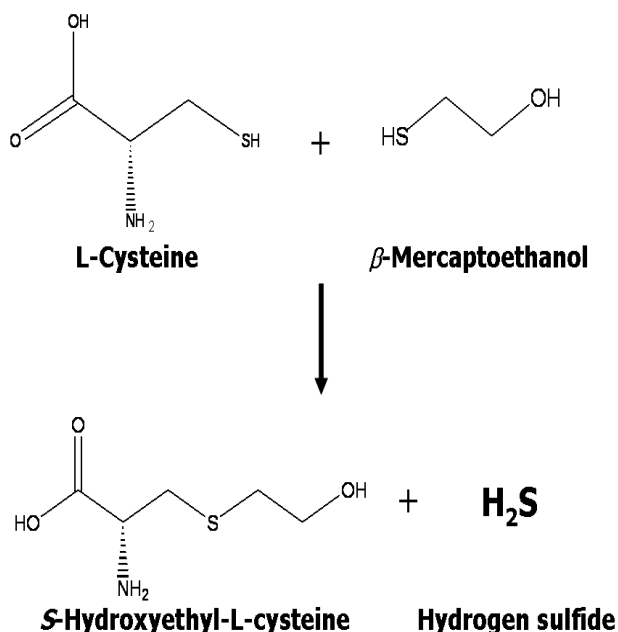


Figure 1. H₂S forming β -replacement reaction scheme.

재료 및 방법

실험재료

L-cysteine, β -mercaptoethanol, PLP는 Sigma (USA)에서 구입하였다. Ion-exchange resin인 DEAE (diethylaminoethyl) Sephacel은 GE Healthcare (UK)에서 구입하였다. Buffer A는 50 mM potassium phosphate buffer (+0.1 mM PLP, +7 mM β -mercaptoethanol, pH 7.1)이고 Buffer B는 Buffer A에 1 M의 NaCl을 첨가하여 사용하였다. 효모의 파쇄는 Bertin precellys 24 (Bertin technology, France)를 사용하였다. UV-visible 흡수 스펙트럼은 Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA)를 사용하였고, MS 분석은 ABI4700-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Framington, MA, USA)를 사용하였다.

균주 및 배양조건

본 실험에서는 야생형의 효모 (*S. cerevisiae*)로 BY4741 (ATCC 201388)과 야생형의 효모에서 CBS의 유전자가 제거된 CYS4 (ATCC 4006696) 그리고 OASS의 유전자가 제거된 MET17 (ATCC 4005211)를 사용하였다. 야생형의 효모의 배양을 위한 배지로 복합 영양 배지인 YEPD (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% dextrose)를 사용하였고, CYS4와 MET17은 L-glutathione의 결핍을 고려하여 YEPD에 filter로 여과한 L-glutathione을 30 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가하였다. 모든 효모의 배양 조건은 30°C, 250 rpm을 유지하여 15시간 진탕 배양 하였다.

단백질정량과 H₂S 형성 활성측정

단백질 정량은 Bradford 방법에 의해 UV-visible 흡수스펙트럼을 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준시료는 Bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다(20). 그리고 이온교환 칼럼 분석은 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 상대적인 단백질량을 측정 하였다. 황화수소를 생성할 수 있는 단백질의 활성은 기질인 L-cysteine과 β -mercaptoethanol이 각각 10 mM을 포함한 KPB (최종농도 50 mM)에 0.4 mM의 Pb-acetate, 50 μ M의 PLP를 포함한 조성의 용액에 효모의 crude extract와 반응시켰다. 반응은 37°C에서 5분간 수행하였고, 생성된 Pb-S 침전을 UV-visible 흡수스펙트럼의 360 nm에서 흡광도를 측정하였다(4, 5).

단백질의 정제

효모균체 2 g/ml (0.1 M KPB, pH 7.0) 0.5 ml와 glass bead (직경 0.5 mm)를 1 : 1 (부피비)로 하여 bead beater로 5분간 효모 파쇄를 하였고, 원심 분리를 이용하여 glass bead를 제거한 효모의 crude extract를 조제하였다. Buffer A로 평형화시킨 DEAE-Sephacel 컬럼에 crude extract를 흘려 흡착시킨 후, buffer A를 이용하여 컬럼을 세척한 후, buffer B와의 비율 높이면서, 즉 NaCl의 농도를 0 M에서 1 M까지 점진적으로 증가시키면서 단백질을 분리 용출시켰다. Pb-S 침전을 생성하는 분획을 확인한 후, 투석과 농축을 하여, 10% native PAGE를 실시하였다. Native PAGE gel 상에서 효소 활성에 의해 생성된 황화수소가 활성측정 용액에 포함된 Pb-acetate 용액과의 반응으로 생성된 침전인 Pb-S로 검게 염색된 부분을 확인할 수 있었다. 검은 색으로 염색된 부분과 동일한 위치의 gel을 잘라내었다.

잘라 낸 조각은 다시 12.5% SDS-PAGE로 분리하여 MALDI-TOF MS 분석 시료로 사용하였다.

MALDI-TOF MS 분석

황화수소형성 단백질을 포함한 SDS-PAGE의 gel 조각은 단백질 가수분해 효소인 trypsin 0.015 ug/ml이 포함된 50 mM ammonium bicarbonate 용액에서 37°C에서 12시간 in-gel digest 과정을 거치고, Zip-tip을 이용하여 여과된 시료를 준비하였다. MALDI-TOF를 이용하여 peptide mass fingerprinting (PMF)과 MS/MS ion search 방식의 분석을 통해 얻은 아미노산 서열 분석 자료를 NCBI non-redundant database의 Mascot (Matrix Science) software를 이용하여 황화수소 형성 단백질과 일치하는 단백질의 종류를 확인하였다(21).

결과 및 고찰

야생형 효모에서의 황화수소 생성 관련 단백질 확인

야생형 효모로부터 얻은 crude extract를 native PAGE로 단백질들을 분리하여 황화수소의 생성을 확인한 결과, 두 개의 검은 띠가 생성되었다(Fig. 2, lane 2). 이는 두 종류의 단백질이 황화수소를 형성할 수 있다는 것이다. 본 단백질은 L-cysteine과 β-mercaptoethanol의 반응에서 β-replacement 반응이 가능한 효소인 CBS와 OASS로 추측이 되었고, 이를 확인하기 위해 각 효소가 제거된 CYS4와 MET17 효모들을 이용하여 동일한 실험을 수행 하였다. MET17 효모를 이용한 결과 야생형 효모의 native PAGE gel에서 두 번째 띠가 나타나지 않았다(Fig. 2, lane 1). 이는 wild type native PAGE gel상의 상단에서 첫 번째 띠는 CBS에 의한 것을 의미한다. CYS4 효모의 native PAGE 결과, wild type native PAGE gel상의 상단 첫 번째 띠가 관찰되지 않았다. 나타난 두 번째 띠는 OASS에 의해 생성된 것으로 생각된다(Fig. 2, lane 3). 앞으로의 실험은 두 효소의 간섭을 피하고, 정제의 편의를 도모하기 위해 CYS4와 MET17 효모들을 사용하기로 하였다.

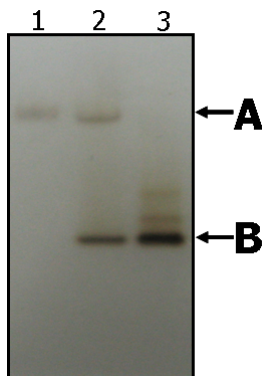


Figure 2. H₂S forming activity analysis on native PAGE. Lanes; 1, MET17 yeast crude extract; 2, wild type yeast crude extract; 3, CYS4 yeast crude extract; Each 140 ug protein was loaded. Upper band and lower band indicated by A and B, respectively.

CBS와 OASS 분리정제와 MALDI-TOF MS 분석 시료 준비
MET17과 CYS4 효모의 crude extracts (각각 50 mg과 81 mg)

를 DEAE Sephacel column chromatography를 이용하여 정제 하였다. MET17 효모의 crude extract의 column 용출액은 5 ml씩 분취하였으며 각 용출액은 96 well에 분취하여 황화수소형성 반응액과 혼합하여 검은 침전의 형성을 확인하였다(Fig. 3A). 각 분획의 상대적인 단백질의 양과 황화수소형성 활성을 UV-visible 흡광으로 확인하여 그래프로 나타내었다(Fig. 4A). MET17 효모의 crude extract에서 활성분획은 NaCl의 농도가 0.3-0.4 M에서 용출되어 결과적으로 12-14번 분획에 포함되어 있음을 확인할 수 있었다.

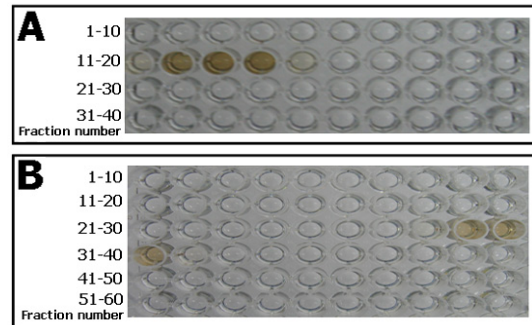


Figure 3. H₂S formation analysis after DEAE Sephacel column chromatography; (A), MET17 yeast crude extract and (B), CYS4 yeast crude extract.

CYS4 crude extract의 column 용출액은 3 ml씩 분취를 하였고, 황화수소형성 활성으로 인한 용액의 색 변화(Fig. 3B)와 각 분획의 상대적인 단백질의 양과 활성을 그래프로 나타내었다(Fig. 4B). CYS4 효모의 crude extract에서 활성분획은 NaCl의 농도가 0.4-0.5 M에서 용출되었고, 29-31번 분획에 포함되어 있음을 확인할 수 있었다.

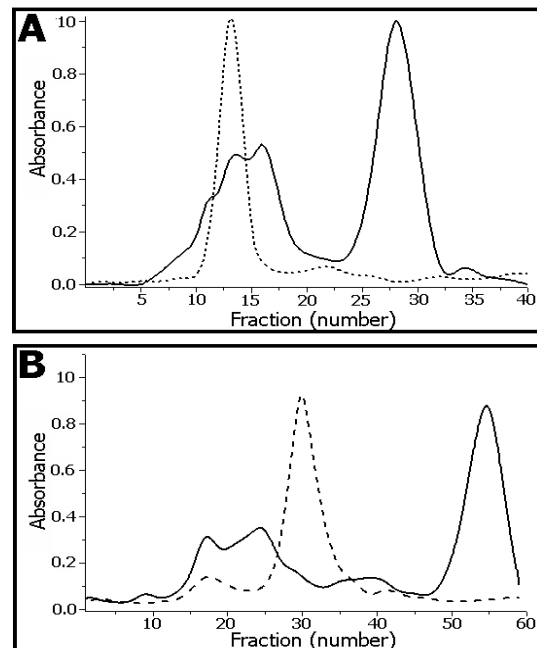


Figure 4. Elution profiles of DEAE column chromatography of MET17 (A) and CYS4 (B). H₂S forming enzyme activity (dotted line) and eluted protein patterns (solid line) were measured at 360 nm and 280 nm absorbance, respectively.

Column 분획 중, Pb-S의 생성으로 용액의 색이 변한 MET17의 12에서 14번 분획(Fig. 3A)과 CYS4의 29-30번 분획(Fig. 3B)들의 용액은 합쳐서, 투석으로 염을 제거하고, centricon tube (Millipore, 10 kDa molecular weight cut-off)를 사용하여 농축하였다. 농축한 분획 (8 mg/ml)들은 native PAGE를 사용하여 분획 내의 단백질을 분리한 후, Pb-acetate를 사용한 H₂S의 측정방법으로 native PAGE gel 상의 CYS4 단백질과 MET17의 단백질 활성으로 만들어진 Pb-S 띠로 위치를 확인하였다. 그리고 Coomassie Brilliant Blue (CBB) 용액으로 native PAGE gel을 염색하였고(Fig. 5), High molecular weight (HMW) marker (Amersham Biosciences, UK)와의 비교로 변성되지 않은 단백질의 대략의 분자량을 짐작할 수 있었다. 결과 MET17에서 얻어진 단백질은 400 kDa (Fig. 5A, lane 1), CYS4에서 얻어진 단백질은 100 kDa 정도의 분자량으로 확인이 되었다(Fig. 5B, lane 1). CBS의 경우 octamer (400 kDa), tetramer (220 kDa), 그리고 C말단인 잘린 truncated dimer (78 kDa)등 여러 형태가 보고되었고(17), 본 실험에서는 octamer 구조를 하고 있을 확률이 높았으나(Fig. 5A) 결과적으로 400 kDa의 단백질은 CBS와 cystathionine γ -lyase의 효소복합체를 알았으므로 그 oligomeric 구조는 확실하지 않다. 그리고 OASS의 경우는 tetramer (200 kDa) 형태가 보고되었고(22), 실험을 통해서는 dimer 형태라고 생각되는 100 kDa의 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 이렇게 native PAGE gel 상에 Pb-S로 염색된 CBS와 OASS를 포함한 부위만을 잘라낸 후, 5 X SDS sample 처리 buffer와 100°C에서 5분간 boiling 후, SDS PAGE를 수행하였다. 결과 native PAGE gel 상의 400 kDa 정도의 분자량을 가졌던 MET17 단백질은 SDS PAGE gel 상에서 55 kDa과 40 kDa의 분자량을 보였고, CBS와의 다른 단백질이 포함 되어 있을 가능성을 확인하였다(Fig. 6A). 100 kDa 정도의 분자량을 보였던 CYS4 효모 유래 단백질은 45 kDa의 분자량을 보였다(Fig. 6B). 이렇게 얻어진 SDS PAGE의 단백질 띠에서 단백질을 분리하여, MALDI-TOF MS 분석 시료로 사용하였다.

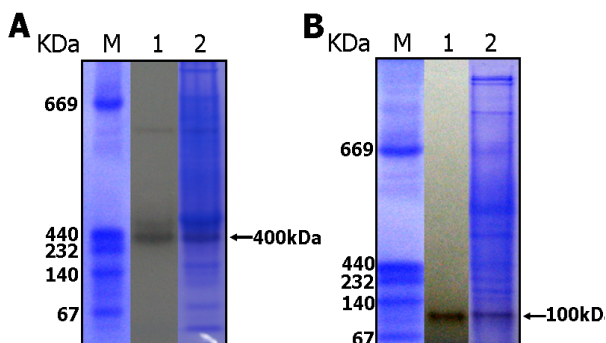


Figure 5. Native PAGE analysis of fractions producing H₂S. Lanes; M, molecular mass protein standards (molecular mass in kDa in parentheses) thyroglobulin (669), ferritin (440), catalase (232), lactate dehydrogenase (140), and bovine serum albumin (67). A and B gels indicated the active fractions of MET17 and CYS4 after DEAE column chromatography, respectively. The active bands were appeared at 400 kDa in A and 100 kDa in B. Lane 1 and 2 indicated the activity stained gel and Coomassie brilliant blue stained gel, respectively.

MALDI-TOF MS 분석

SDS PAGE 분석으로부터 황화수소를 형성하는 MET17 단백질

(Fig. 6 a and b)과 CYS4 단백질(Fig. 6, c)이 포함된 부분을 잘라 단백질을 추출하여 MALDI-TOF MS 분석을 하였다.

CYS4로부터 얻어진 단백질은 (Fig. 6, c) 일반적으로 간편한 PMF (peptide mass fingerprinting) 방법으로 분석 하였다. Trypsin 처리로 K (lysine)과 R (arginine)의 C 말단 결합 부위를 끊어 얻어진 펩티드들의 분자량으로부터 가능한 아미노산 서열을 분석하고, OASS의 아미노산 서열과 일치하는 아미노산 서열 부분을 나타내었다(Fig. 7, C). OASS는 *O*-acetyl-L-serine과 황화수소 이온 (HS⁻)을 기질로 사용하여 β -replacement 반응을 통하여 acetate와 L-cysteine의 형성을 촉매 하는 효소로 알려져 있고(23), 본 실험의 결과 OASS는 L-cysteine과 β -mercaptoethanol의 β -replacement 반응도 촉매하여 황화수소를 생성할 수 있음을 확인 하였다. OASS와 CBS는 모두 비타민 B6인 pyridoxal 5'-phosphate를 보조효소로 사용하는 효소이고 황화수소의 생성기작은 CBS와 동일하다고 생각된다. 실험결과는 table 1에 나타내고 있다.

Table 1. Identified proteins by MALDI-TOF MS spectrometry
MS/MS ion search

Protein name	Score	SDS PAGE data	MALDI-TOF data
		MW (kDa)	MW (kDa)
Cystathionine β -synthase	388	55	55.990
Cystathionine γ -lyase	347	40	42.516

Protein name	Score	SDS PAGE data	MALDI-TOF data
		MW (kDa)	MW (kDa)
<i>O</i> -acetylserine sulfhydrylase	39	45	48.568

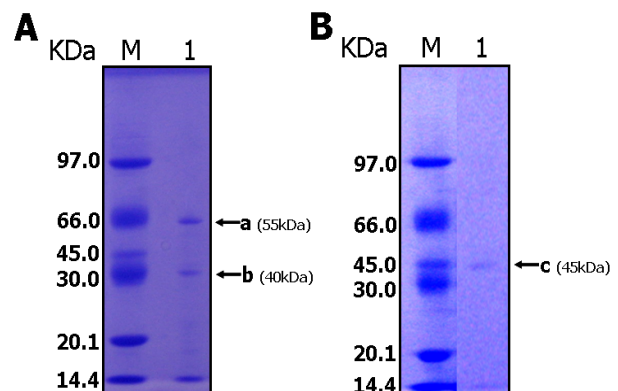


Figure 6. SDS PAGE analysis of extracted proteins from native PAGE. A and B gels indicated the active fractions of MET17 and CYS4 after DEAE column chromatography, respectively. Lanes; M, molecular mass standards (molecular mass in kDa in parentheses) phosphorylase b (97.0), albumin (66.0), ovalbumin (45.0), carbonic anhydrase (30.0), trypsin inhibitor (20.1), and α -lactalbumin (14.4). Lanes 1, MET17 yeast (A) and CYS4 (B) proteins producing H₂S, indicating a (55 kDa), b (40 kDa), and c (45 kDa).

MET17 효모에서 황화수소를 생성할 수 있는 단백질 분석은 SDS PAGE gel 상에서 55 kDa과 40 kDa을 갖는 두 개의 단백질로 나타났다. 이는 native gel 상에서 황화수소 형성을 확인한 실험에서는 단일밴드를 보였고(Fig. 2, lane 1) DEAE column chromatography의 elution pattern 결과(Fig. 4, A) 활성 그래프 (dotted line)에서 shoulder가 보이지 않은 점, 그리고

각 분획들의 황화수소의 활성측정결과에서(Fig. 3, A), Pb-S의 형성이 활성그래프와 일치하는 점, 즉 침전형성 강도가 두 부분으로 나뉘지 않은 점으로 보아 native 상태에서는 cysteine 형성 pathway에 있는 연관성이 높은 두 단백질이 효소복합체를 형성하고 있을 가능성이 큰 것으로 생각된다. MET17 효모에서 얻어진 두 단백질의 분석에서는 정확한 아미노산 서열분석이 가능한 MS/MS ion search에 의한 MALDI-TOF MS 분석을 하였다(Table 1). 결과와 일치하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 Mascot로 동정한 결과 Fig. 6의 a 띠는 CBS, Fig. 6의 b 띠는 cystathionine γ -lyase로 동정되었는데, MALDI-TOF MS data와 일치하는 CBS와 cystathionine γ -lyase의 아미노산의 서열을 Fig. 7에 나타내고 있다. Cystathionine γ -lyase는 CYS3 유전자에 의해서 만들어 지는 단백질로써 L-cystathionine을 L-cysteine과 암모니아 그리고 α -ketobutyrate를 형성하는 효소이다. Cystathionine γ -lyase는 CBS와 함께 L-serine으로부터 L-cysteine의 합성 경로에 관여하는 효소로서 포유동물의 뇌와 신경조직에서 CBS와 동일한 방법으로 황화수소를 생성하는 효소로 알려져 있다(15, 24). 이상의 결과들을 종합하면, 본 연구에서, 효모에서 황화수소를 생성하는 단백질들을 간편하고 정확하게 동정할 수 있는 방법을 확립하였다.

A

1 MAKSEQQTDS RHNVIDLVGN TPLIALKKLP KALGIKPIY AKLELYNPGG SIKDRIAKSM
 61 VEAEASGRH PSRSTLIPT SNGTGIGLAL IGAIGYRTI ITWPERMSNE KVSYLKALGA
 121 EIIRTPTVAA WDPESHIGV AKLEKEIPG AVILDQYNNM MTPBAHYFGT GREIQROLED
 181 **LMLFDNLRAV** VAGAGTGGTI SGISKYLKEQ NDKIQIVGAD PFGSILAQPE NLNMTDITDY
 241 **KVEGIGYDFV** **POVLDR**KLID VYKTDKPS FKYARQLISN EGVLVGGSSG SAFTAVVKYC
 301 EDHEPELTEDD VIVAIFPDSI RSYLTKFVDD EWLK**KNNLWD** **DDVLAR**FDSK KLEASTTKYA
 361 DVFGNATVKD LHLKPVVSVK ETAKVTDVIK ILKDNQFDQL PVLTEYKGLS GLVTLSELLR
 421 KLSINNSMND NTKVVEYLDV KKLNNFVDSV SYNENKSGKK KFIKFDENSK LSDLNRFEE
 481 NSSAVITDGL KPIHIVTRMD LLSYLA

B

1 MTLQESDKFA **TFATHAGEHV** DVHGVSIEPI SLSTTFKQSS **PANFIGTYEY** SRSQNPNREN
 61 LERAVAALEN AQYGLAFSSG SATTATILQS LPQGSHAVSI GDVYGGTHRY FTKVANAAGV
 121 ETSFTNDLLN DLPQLIKENT KLVWIEPTPN PTLKVTDIQK VADLIKKHAA QQDVILVVDN
 181 TFLSPYISNP LNFADIVVH SATKYINGHS DVVLGVLATN NKPLYER**LQF** **LQNAIGAPS**
 241 **PFDAWLTHRG** LKTLHLVRQ AALSANKIAE FLAADKENVV AVNYPLKTH PNYDVVLRQH
 301 RDAIGGGMIS FRIKGAEEA SKFASSTRLF TLAESIGGIE SLEVPVAMT HGGIPKEARE
 361 ASGVFDDLVR ISVGIEDTDD LLEDIQALK QATN

C

1 **MESHFDTVQL** **HAGQENPGDN** AHRSFRAVFIY **ATTSYVFENS** **KHGSQFLGLE** **VPGYVYSRFQ**
 61 **NPTSIVLEER** IAALGGAAA LAVSSGQAAQ TLAIQGLAHT GDNIVSTSYL YGGTYNQEKI
 121 SFRK**FGIEAR** **FVEGDNPEEF** **EKVFDERTKA** VYLETIGNPK YNVPDEFKIV AIAKHGPIV
 181 VVDNFTGAGG YFCQPIKYGA DIVTHSATKW IGGHGTIGG IIVDSGKFPW KDYPEKFPQF
 241 SQPAEGYHGT IYNEAYGNLA YIVHVRTPELL RDLGPIIMNPF ASFLLQGV E TSLRAERHG
 301 ENALKLAKWL EQSPYVSVS YPGLASHSHH ENAKKYSNG FGGVLSFGVK DLPNAD**ETD**
 361 **PKLSGAQV**V DNLKIASNLA NVGDAR**TLVI** **APYFTTHKQL** NDKEKIASGV **TKDLIR**VSVG
 421 IEFIDDIAD FQQSFETVFA GQKP

Figure 7. The comparison of MALDI-TOF MS data with CBS (A), cystathionine γ -lyase (B), and OASS (C), respectively. The part of bold and underlined peptides exhibited the exact matching.

요약

생체에서의 황화수소는 의약 분야와 발효 산업에 있어서 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구에서는 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 기질인 L-cysteine과 β -mercaptoethanol로부터 β -replacement 반응에 의한 황화수소를 발생시킬 수 있는 효소

를 간편하고 신속하게 동정하는 방법의 확립을 목적으로 하였다. 효소에 의해 발생된 황화수소와 Pb-acetate의 반응으로 생성된 Pb-S를 gel상에서 간편하게 확인한 후, 확인된 단백질을 이온교환컬럼을 수행한 후 gel에서 추출하는 방법으로 MALDI-TOF MS의 시료를 간단히 얻을 수 있었다. PMF 방법과 MS/MS ion search 분석을 통해 간편하게 효모에서 황화수소를 형성할 가능성이 있는 세가지 단백질의 동정에 성공하였다. 이 세 가지 단백질은 CYS3, CYS4, MET17 유전자의 단백질로서 cystathionine γ -lyase, CBS, OASS 임이 밝혀졌다. 그리고 이 세 단백질들은 L-cysteine과 β -mercaptoethanol의 존재하에서 황화수소를 실제로 생성함을 확인하였다. 본 연구에서 표적의 물질을 생산하는 단백질들을 젤상에서의 활성측정과 MALDI-TOF MS를 이용하여 간단히 그리고 정확하게 동정하는 방법을 확립하였다.

감사

이 논문은 2006~2008년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (R01-2006-000-10232-0).

REFERENCES

- Kimura, H. (2002), Hydrogen sulfide as a neuromodulator, *Mol. Neurobiol.* **26**(1), 13-19.
- Eto, K., T. Asada, K. Arima, T. Makifuchi, and H. Kimura (2002), Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**(5), 1485-1488.
- Eto, K. and H. Kimura (2002), The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-L-methionine in mouse brain, *J. Neurochem.* **83**(1), 80-86.
- Chen, X., K. H. Jhee, and W. D. Kruger (2004), Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine, *J. Biol. Chem.* **279**(50), 52082-52086.
- Jhee, K. H., H. N. Cho, S. A. Yang, and I. S. Lee (2007), Biochemical characteristics for the cofactor free mutant of yeast homocysteine catalyzing enzyme, cystathionine β -synthase, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**(3), 196-202.
- Shan, X. and W. D. Kruger (1998), Correction of disease-causing CBS mutation in yeast, *Nat. Genet.* **19**, 91-93.
- Spiropoulos, A. and L. F. Bisson (2000), MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(10), 4421-4426.
- Mendes-Ferreira, A., A. Mendes-Faia, and C. Leao (2004), Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry, *J. Applied Microbiology* **97**, 540-545.
- Matthews, A., A. Grimaldi, M. Walker, E. Bartowsky, P. Grbin, and V. Jiranek (2004), Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(10), 5715-5731.
- Edwards, C. G. and J. C. Bohlscheid (2007), Impact of pantothenic acid addition on H₂S production by *Saccharomyces* under fermentative conditions, *Enzyme and Microbial Technology* **41**, 1-4.
- Linderholm, A. L., C. L. Findleton, G. Kumar, Y. Hong, and L. F. Bisson (2008), Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(5), 1418-1427.
- Hansen, R., S. Y. Pearson, J. M. Brosnan, P. G. Meaden, and

- D. J. Jamieson (2006), Proteomic analysis of a distilling strain of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial grain fermentation, *Appl. Biochem. Biotech.* **72**, 116-125.
13. Trabalzini, L., A. Paffetti, A. Scaloni, F. Talamo, E. Ferro, G. Coratza, L. Bovalini, P. Lusini, P. Martelli, and A. Santucci (2003), Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.* **370**, 35-46.
 14. Linderholm, A. L., T. L. Olineka, Y. Hong, and L. F. Bisson (2006), Allele diversity among genes of the sulfate reduction pathway in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Am. J. Enol. Vitic.* **57**(4), 431-440.
 15. Ono, B. I., T. Hazu, S. Yoshida, T. Kawato, S. Shinoda, J. Brzwczy, and A. Paszewski (1999), Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation, *Yeast* **15**(13), 1365-1375.
 16. Swiegers, J. H. and I. S. Pretorius (2007), Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 954-960.
 17. D'Andrea, R., Y. Surdin-Kerjan, G. Pure, and H. Cherest (1987), Molecular genetics of met17 and met25 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: intragenic complementation between mutations of a single structural gene, *Mol. Gen. Genet.* **207**, 165-170.
 18. Jhee, K. H., P. McPhie, and E. W. Miles (2000), Domain architecture of the heme-independent yeast cystathionine β -synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation, *Biochemistry* **39**(34), 10548-10556.
 19. Kruger, W. D. and D. R. Cox (1994), A yeast system for expression of human cystathionine β -synthase: structural and functional conservation of the human and yeast genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 6614-6618.
 20. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
 21. Münchbach, M., M. Quadroni, G. Miotto, and P. James (2000), Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety, *Anal. Chem.* **72**, 4047-4057.
 22. Yamagata S. (1976), *O*-Acetylserine and *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase of yeast. Subunit structure, *J. Biochem.* **80**(4), 787-797.
 23. Strambini, G. B., P. Cioni, and P. F. Cook (1996), Tryptophan luminescence as a probe of enzyme conformation along the *O*-acetylserine sulfhydrylase reaction pathway, *Biochemistry* **35**(25), 8392-8400.
 24. Szabo, C. (2007), Hydrogen sulphide and its therapeutic potential, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **6**(11), 917-935.