

## 질량분석기를 활용한 효과적 이황화결합 분석법 개발

진중화 · 민호필\* · 권오승\* · 오현정\*\* · 김종원† · 박철환\*\*\*†

오송첨단의료산업진흥재단 신약개발지원센터  
28160 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 123

\*한국과학기술연구원 도핑컨트롤센터  
02792 서울특별시 성북구 화랑로14길 5  
\*\*고려대학교 기계공학과

02841 서울특별시 성북구 안암로 145  
\*\*\*광운대학교 화학공학과

01897 서울특별시 노원구 광운로 20

(2016년 10월 17일 접수, 2016년 11월 2일 수정본 접수, 2016년 11월 7일 채택)

### Mass Spectrometry-Based Strategy for Effective Disulfide Bond Identification

Jonghwa Jin, Hophil Min\*, Oh-Seung Kwon\*, Hyun Jeong Oh\*\*, Jongwon Kim† and Chulhwan Park\*\*\*†

New Drug Development Center, Osong Medical Innovation Foundation, 123, Osong Saengmyung-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju, Chungbuk, 28160, Korea

\*Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology (KIST), 5, Hwarang-ro 14-gil, Seongbuk-gu, Seoul, 02792, Korea

\*\*School of Mechanical Engineering, Korea University, 145, Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul, 02841, Korea

\*\*\*Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, 20, Kwangwoon-ro, Nowon-gu, Seoul, 01897, Korea

(Received 17 October 2016; Received in revised form 2 November 2016; accepted 7 November 2016)

### 요 약

이황화결합(Disulfide Bond)은 다양한 생리학적 혹은 병리학적인 과정 중 단백질변역 후 변형(Post-Translational Modifications) 과정 중에 형성된다. 그러므로 이황화결합에 대한 정보는 단백질의 화학적 구조를 보다 종합적으로 이해하는데 매우 중요한 일이다. 질량분석기를 이용한 이황화결합 분석은 매우 효과적이며, 현재까지 질량 분석기를 활용한 다양한 이황화결합 분석법들이 개발되었다. 그러나, 대부분의 이황화결합 분석법의 경우, 이황화결합 분석 시 자유-시스테인잔기(Free Thiol Residues) 분석을 고려하지 않았다. 본 연구에서는 이황화결합에 관여하는 시스테인/자유-시스테인에 초점을 두고 총 4단계(1단계: 아미노산 서열을 통한 이황화결합 가능 부위를 예측, 2단계: 자유시스테인의 존재 유무의 확인, 3단계: 질량 분석기를 활용한 이황화결합 분석, 4단계: 이황화결합 분석법의 종합적인 검증)의 분석법을 개발하였다. 나아가, 본 연구에서 개발된 분석 기법을 실제 휴먼 유래 재조합 단백질(HRPE1)에 적용함으로써 개발된 이황화결합 분석법의 효용성을 확인하였다. HRPE1의 경우, 총 6개의 이황화결합(Inter-chain 형태: 1, Intra-chain 형태: 5)으로 구성된 것을 최종 확인하였다.

**Abstract** – The determination of disulfide bonds is important for comprehensive understanding of the chemical structure of protein. So far, many strategies for the disulfide bond analysis have been suggested in terms of speed and sensitivity. However, most of these strategies have not considered free thiol residues in the target protein in the process of determining the disulfide bond. We suggested the strategy which was composed of four steps for the identification of disulfide bonds; the first step was the prediction of possible disulfide bonds, the second step was the determination of free cysteine residues, the third step was the analysis of disulfide bond using a high-resolution mass spectrometry, and the final step was the determination of disulfide bonds based on the comprehensive verification. In this study, we performed the characterization of disulfide bonds for the recombinant protein (HRPE1), where 1 and 5 inter- and intra-chain disulfide bonds were identified, respectively.

Key words: Disulfide bond, Free-thiol group, Mass spectrometry, Peptide mapping

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jonwkim@kbiohealth.kr (J. Kim), chpark@kw.ac.kr (C. Park)

‡ 이 논문은 광운대학교 한 춘 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서 론

티올(Thiol)은 대부분 체액에서 발생하여 낮은 분자량의 이황화물과 결합하거나 자유 형태로 순환하며, 대사 과정과 관련되어 있다[1]. 세포 과정에서 문제가 생기면 체액 내의 티올과 이황화물의 양이 변화한다[2]. 티올은 시스테인, 글루타치온, 메르캡토에탄올 등에 있으며, -SH기를 갖고 있기 때문에 -SH기 사이에서 이황화결합(Disulfide Bond)을 형성한다. 그 중에서도 시스테인은 20개의 아미노산 중 유일하게 -SH기를 포함한다[3,4]. 이러한 시스테인의 -SH간 이황화결합은 단백질의 다양한 생리학적, 병리학적 과정의 번역 후 수정을 통해 형성되며 구조 변화를 이루며 단백질의 2차, 3차 구조를 결정하는데 중요한 역할을 한다[5,6].

단백질의 구조와 생물학적 기능을 이해하는데 있어 이황화결합의 분석은 필수적이며, 신속하고 높은 감도의 다양한 이황화결합 분석법이 요구되고 있다[1]. 결정학 및 NMR은 최소한의 이황화결합 변화를 식별하는데 뛰어난 기술이며[7], Edman Degradation도 이황화결합의 식별에 사용된다[6]. 하지만 위의 분석 전략들은 단백질의 크기, 필요한 양, 시료의 순도에 크게 영향을 받는다는 한계를 지니고 있다[3,5]. 질량분석장비를 이용한 분석법도 이황화결합을 식별하는데 적합하다. MALDI-MS, ESI-MS를 이용한 이황화결합의 패턴 분석은 이미 밝혀져 있다. 부분적인 환원(Reducing)조건 또는 비환원(Non-reducing)조건에서도 이황화결합 패턴이 분석되었다. 부분적 환원조건은 이황화결합을 분석하는데 널리 사용되는 접근법으로, 다른 환원반응속도를 가지는 이황화결합이 차례로 환원되고 알킬화되는 조건에서 단백질이 분해된다. 그러나 고도로 가교되어 있는 단백질의 경우, 완벽한 이황화물 분석을 위해서는 여러 번의 환원과 분리과정이 필요하다[8-10]. 비환원 조건에서 절단되는 단백질의 분석은 이황화결합의 패턴 분석에서 자주 사용된다. 또한, 적절한 효소를 사용한 절단으로 이황화결합 패턴을 보다 효과적으로 분석이 가능하다[11,12].

질량분석장비를 이용한 분석법은 펨토몰(Femtomole) 단위의 높은 감도를 구현하기 때문에 샘플의 양이 제한된 상황에서 시스테인 잔기를 분석할 수 있는 우수한 방법 중 하나이다[13,14]. 본 연구에서 사용된 질량분석장비는 초고분해능 질량분석기(High-Resolution Mass Spectrometry: Q-Exactive)로 기존의 분석법보다 높은 감도로 샘플 분석이 가능하다는 장점을 가진다. 질량분석장비를 이용한 분석법의 샘플준비단계는 TCEP (Tris-2-Carboxyethylphosphine Hydrochloride), DTT (Dithiothreitol)를 이용하여 시스테인 간의 이황화결합을 절단해주는 환원반응과 IAA (Iodoacetamide), NEM (N-Ethylmaleimide), M-biotin을 이용한 알킬화 반응을 통해 -SH기 간의 이황화결합이 다시 이루어지는 것을 방지하는 과정으로 이루어진다. 이황화결합은 가역적인 결합이므로 이러한 과정을 통해 시스테인을 안정한 상태로 만들어 줄 필요가 있다. 대부분의 분석 전략은 목적 단백질의 이황화결합 분석 시 자유-시스테인 잔기 분석을 고려하지 않는다. 하지만, 이황화결합을 이루고 있는 시스테인과 자유-시스테인의 수와 위치는 단백질의 특성을 결정하는데 더 효율적이고 정확한 정보를 제공할 수 있다.

본 연구에서는 이황화결합을 이루고 있는 시스테인과 자유-시스테인 모두에 초점을 두고 4단계의 분석법 전략을 마련하였다. 첫 번째로 아미노산 서열을 통해 가능한 이황화결합 부위를 예측하였다. 두 번째로 이황화결합 시스테인과 자유-시스테인에 환원 및 알

킬화 반응을 적용하여 자유-시스테인 유무를 확인하였다. 자유-시스테인은 NEM의 유무에 따른 modification 차이를 이용하여 이황화결합 시스테인과 구분지을 수 있었다. 이황화결합 시스테인은 비환원 및 DTT를 이용한 환원과 IAA를 이용한 알킬화 반응 후 세 가지의 가수분해효소(Asp-N, Chymotrypsin, Asp-N&Chymotrypsin) 분해 방법을 통해 분석을 진행하였다. 세 번째로는 초고분해능 질량 분석기(HRMS)를 통해 얻은 분석데이터를 이황화결합 부위 예측 프로그램(PepFinder)과 펩타이드 맵핑(Peptide Mapping) 분석기법을 적용하여 이황화결합 부위를 규명하였다. 마지막으로, 이황화결합 분석법의 종합적인 검증단계를 거쳤다.

본 연구에서는 휴먼유래 재조합 단백질(HRPE1)의 이황화결합을 분석하고 두 가지 종류(Inter-chain 이황화결합, Intra-chain 이황화결합)의 이황화결합 형태로 구분하였다. HRPE1의 경우는 1개의 Inter-chain, 5개의 Intra-chain 이황화결합으로 이루어져 있음을 확인하였다. 본 연구를 통해 제시된 이황화결합 분석법은 자유-시스테인의 존재여부의 확인을 통해 보다 정확한 단백질의 화학적 구조를 파악하는데 매우 효과적이며, 나아가 의약품 개발에서의 이황화결합의 패턴분석을 보다 효율적으로 이해하는데 도움이 될 것으로 기대한다.

## 2. 실험

### 2-1. 실험 재료

실험 재료로 포름산(Sigma, F0507-1L), 디티오트레이톨(Sigma, D0622-10G), 요오도아세트아미드(Sigma, I1149-5G), N-에틸마레이미드(Sigma, E3876-5G), 중탄산암모늄(Sigma, A6141-1KG), 고순도 물(Millipore, Z0343033 508), 아세토니트릴(Millipore, I778229 518), 요소(GE Healthcare, 17-1319-10), 메탄올(Honeywell, AH230-4), 트립신(Promega, V5111), Asp-N (Promega, V1621), 키모트립신(Promega, V1061)을 사용하였다.

### 2-2. 시료전처리(Enzyme digestion)

환원 및 알킬화 과정을 포함한 효소 전처리에서는, 샘플에 8 M urea를 처리하여 단백질을 변성시킨 후, 10 mM 중탄산암모늄(Ammonium Bicarbonate)에 녹인 10 mM DTT (Dithiothreitol)를 이용하여 이황화결합을 환원시켰다. 그 후 55 mM IAA (Iodoacetamide)를 이용해 알킬화시켰다. 알킬화된 샘플은 Chymotrypsin, Asp-N, Chymotrypsin&Asp-N을 이용해 37 °C에서 16시간 동안 반응시켰다.

환원 및 알킬화 과정을 제외한 효소 전처리에서는, 동일한 샘플을 8 M urea를 처리하여 변성시킨 후 환원, 알킬화 과정을 생략하고, Chymotrypsin, Asp-N, Chymotrypsin&Asp-N을 이용해 37 °C에서 16시간 동안 반응시켰다.

### 2-3. 자유-시스테인 분석

HRPE1 내 자유 시스테인을 확인하기 위해 NEM을 처리하였다. NEM을 이용한 전처리 실험을 직접 HRPE1에 수행하기 전에, 먼저 BSA를 이용하여 양성 대조군 실험을 진행하였다. 각각의 샘플에 50 mM NEM을 처리한 후 37 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. NEM 처리된 샘플에 8 M urea를 처리하여 단백질을 변성시킨 후, 10 mM 중탄산암모늄에 녹인 10 mM DTT를 이용하여 이황화결합을

환원시켰다. 그 이후 55 mM IAA를 이용하여 알킬화시켰다. 알킬화된 샘플은 Trypsin을 이용해 37 °C에서 16시간 동안 반응시켰다.

**2-4. 분석기기 및 분석 조건**

효소에 의하여 절단된 펩타이드(0.5 µg)를 C18 컬럼을 통하여 분리하였다. 주입한 펩타이드를 0.1% 포름산을 포함하는 아세트오니트릴을 5%에서 60%까지 상온에서 60분 동안 일정한 기울기로 증가시키는 방법을 통해 분리시켰다. 이동상의 유속을 분당 300 nL로 설정하였고, 분리된 펩타이드는 전자분무 방식을 이용한 질량분석기인 Q-Exactive (Thermo Scientific™)로 주입하였다.

NanoLC-MS/MS 실험은 Waters사의 NanoAcquity 초고성능 액체크로마토그래피와 Thermo사의 나노 전자분무방식 질량분석기(Q-Exactive)를 이용하였다. 펩타이드는 자동 샘플러를 통하여 시료 로딩 컬럼(2 cm long; ID, 180 µm; particle size, 5 µm)과 C18 역상 분석컬럼(10 cm long; ID, 150 µm; particle size, 1.7 µm)으로 주입되었다. 주입한 펩타이드를 0.1% 포름산을 포함하는 아세트오니트릴을 5%에서 60%까지 상온에서 60분 동안 일정한 기울기로 증가시키는 방법을 통해 분리하였다. 이동상의 유속을 분당 300 nL/min로 설정하였고, 분리된 펩타이드는 전자분무 방식을 이용한 질량분석기인 Q-Exactive로 주입되었다. 샘플 분석 전 용매 및 컬럼에 의한 간섭 여부를 판단하기 위한 blank 분석을 수행하였다.

Q-exactive 분석 조건은 다음과 같다. Top12 데이터에 의존 취득법을 사용하였으며, full-scan에서의 MS (m/z) 범위는 350~1,600, 해상도는 70,000 FWHM, AGC는 5×10<sup>4</sup>, 최대 충전 시간은 60밀리초로 설정하여 분석을 진행하였다. MS/MS 질량분석 조건은, 시작 MS 조건은 100 M/Z이며, 해상도는 17,500 FWHM, AGC는 5×10<sup>4</sup>, 최대 충전 시간이 60밀리 초, 표준화 충돌 에너지 NCE 27%, 동적 제외 30초로 설정하여 분석을 진행하였다.

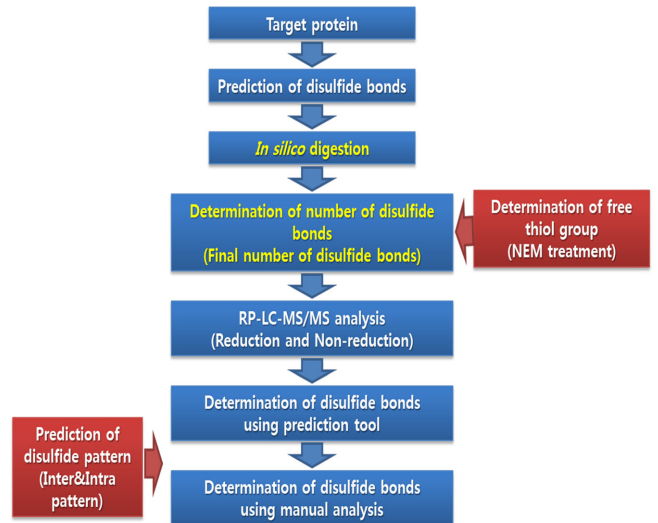
**2-5. 예측 프로그램(PepFinder™ 2.0) 활용 이황화결합 분석**

이황화결합 패턴 분석을 위해서 1차로 비환원조건과 환원조건에서의 MS 스펙트럼 데이터를 얻고, 2차로 이황화결합 예측 프로그램인 PepFinder™ 2.0 (Thermo Scientific, Version: 2.0.15.3)을 활용하여 실제 이황화결합 부위를 규명하였다. 분석은 1단계-타겟 단백질 및 데이터 설정, 2단계-데이터 프로세싱, 3단계-리포트 생성의 총 3단계로 나누어 진행하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3-1. 이황화결합 분석 전략**

본 연구에서는 이황화결합에 관여하는 시스테인/자유-시스테인에 초점을 두고, 총 4단계의 분석법 개발에 대한 전략을 세웠다. 첫 번째 단계에서는 아미노산 서열을 기반으로 한 이황화결합 생성가능 부위를 예측하였다. 두 번째 단계에서는 이황화결합 시스테인과 자유-시스테인에 각각 다른 알킬화 반응을 적용하여 자유 시스테인의 유무를 확인하였다. 자유-시스테인은 NEM의 유무에 따른 modification 차이를 이용하여 최종 이황화결합-시스테인과 구분 지을 수 있었다. 세 번째로는 초고분해능 질량분석기(High-Resolution Mass Spectrometry)를 통해 얻은 분석 데이터를 이황화결합 부위 예측 프로그램(PepFinder™ Software)과 펩타이드 맵핑(Peptide Mapping) 분석 기법을 적용하여 이황화결합 부위를 규명하였다.

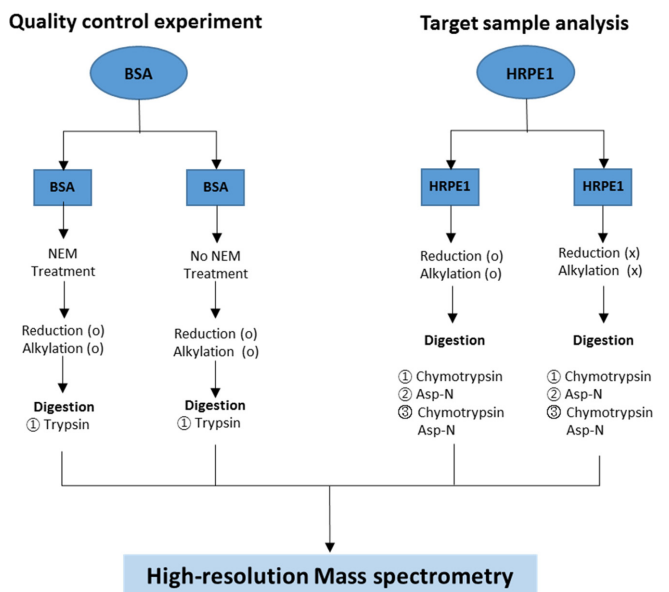


**Fig. 1. Overall scheme of identification of disulfide bond using high-resolution mass spectrometry.**

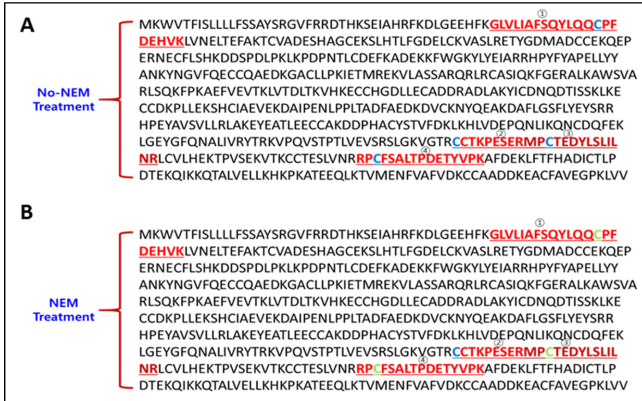
마지막으로 이황화결합 분석법의 종합적인 검증단계를 거쳤다. Fig. 1에 개발된 분석법에 대한 전략을 나타내었다.

**3-2. 자유-시스테인분석 기법의 검증**

자유-시스테인의 존재유무확인법의 경우, 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin) 시료를 활용하여 실제 존재하는 자유-시스테인의 존재 유무를 정확히 규명할 수 있는지에 대한 검증을 수행하였다. 전체적인 실험방법은 NEM 알킬화 반응 처리한 것과 하지 않은 것으로 나누어 자유-시스테인의 존재 여부를 검증하였다. Fig. 2에 자유-시스테인 검증을 위한 실험절차를 나타내었다. 본 실험을 통하여 자유-시스테인의 경우, NEM (125.04768 Da)로 modification된 것을 확인할 수 있었고, 이황화결합의 시스테인의 경우, Carbamidomethyl (57.02146 Da)로 modification된 것을 확인할 수 있었다. Fig. 3과



**Fig. 2. LC-MS/MS procedure of quality control and target sample analysis.**



**Fig. 3. The result of identified free thiol group in bovine serum albumin (BSA). (A) The result of identification of free thiol group in No-NEM treatment condition. (B) The result of identification of free thiol group in NEM treatment condition.**

Table 1에 소혈청알부민에서 확인된 4개의 자유 시스테인을 나타내었다.

**3-3. 아미노산 서열 기반 HRPE1의 이황화결합 부위 예측**

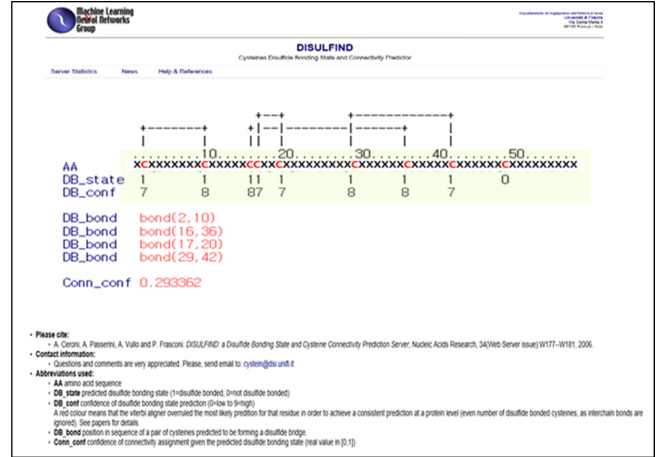
본 연구에서는 1차적으로 이황화결합 분석을 위한 분석기법을 개발하고 2차로 개발된 분석기법을 휴먼유래 재조합 단백질 (HRPE1)에 적용함으로써 본 연구에서 개발된 이황화결합 분석기법의 효용성을 확인하고자 하였다. HRPE1 단백질의 경우, 총 58개의 아미노산으로 구성되었으며, 이 중 9개의 아미노산이 시스테인으로 구성되었다. HRPE1 단백질의 아미노산 서열분석을 통한 이황화결합 가능부위를 예측을 위해 “DISULFIND” 프로그램을 사용하였다(http://disulfind.dsi.unifi.it). 분석결과 총 4개(Bond 1: 2~10, Bond 2: 16~36, Bond 3: 17~20, Bond 4: 29~42)의 이황화결합 부위가 예측되었다(Connection Confidence: 0.293). Fig. 4에 예측된 이황화결합 부위를 나타내었다.

**3-4. HRPE1단백질에 대한 자유-시스테인 분석**

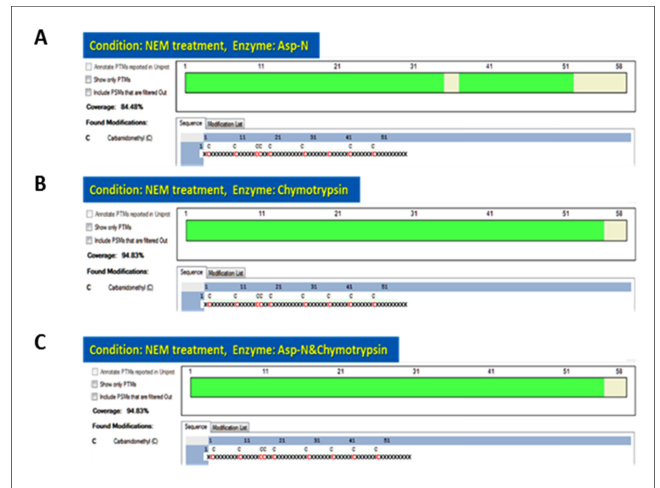
HRPE1의 자유-시스테인 분석을 위해 NEM 알킬화 반응 처리한 것과 하지 않은 것으로 나누어 자유-시스테인의 존재여부를 검증하였다. NEM 처리는 2차 알킬화(Carbamidomethyl)처리 전에 수행하였으며, HRPE1에 자유-시스테인이 존재한다면, 해당 자유-시스테인은, NEM (125.04768 Da)으로 modification되며, 이황화결합-시스테인은, Carbamidomethyl (57.02146 Da)로 modification된다.

**Table 1. Identified free thiol residues for BSA in no-NEM and NEM treatment conditions**

N	Sequence	Condition (NEM)	Charge	RT	m/z	Modification
1	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	NEM treatment (without)	1	25.52	2492.266	C14-Carbamidomethyl (57.02146 Da)
	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	NEM treatment (with)	1	25.66	2560.290	C14-Nethylmaleimide (125.04768 Da)
2	CCTKPESER	NEM treatment (without)	1	9.71	1166.491	C1-Carbamidomethyl (57.02146 Da) C2-Carbamidomethyl (57.02146 Da)
	CCTKPESER	NEM treatment (with)	1	4.15	1234.519	C1-Nethylmaleimide (125.04768 Da) C2-Carbamidomethyl (57.02146 Da)
3	RPCFSALTPDETYVPK	NEM treatment (without)	1	15.31	1880.920	C3-Carbamidomethyl (57.02146 Da)
	RPCFSALTPDETYVPK	NEM treatment (with)	1	17.05	1948.950	C3-Nethylmaleimide (125.04768 Da)
4	MPCTEDYLSLILNR	NEM treatment (without)	1	54.59	1724.836	C3-Carbamidomethyl (57.02146 Da)
	MPCTEDYLSLILNR	NEM treatment (with)	1	25.01	1792.859	C3-Nethylmaleimide (125.04768 Da)



**Fig. 4. The result of prediction of disulfide bond using prediction tool based on the amino acid sequence (DISULFIND, http://disulfind.dsi.unifi.it/).**



**Fig. 5. The result of identified free thiol group in HRPE1 protein. Identified result of free thiol group in Asp-N (A), Chymotrypsin (B), and Asp-N&Chymotrypsin (C) treatment conditions.**

HRPE1의 자유-시스테인 분석결과, 9개 모두 Carbamidomethyl (57.02146 Da)로 modification됨을 확인하였다. 따라서, HRPE1에는 자유-시스테인이 없는 것으로 확인되었다. Fig. 5에 HRPE1에 대한 자유-시스테인 분석 결과를 나타내었다.

3-5. 질량 분석기를 활용한 이황화결합 분석

효과적인 이황화결합 분석을 위하여, 본 연구에서는 1차로 비환원 조건과 환원조건에서 HRPE1의 질량분석 스펙트럼을 얻고, 2차로

이황화결합 예측프로그램(PepFinder™ software)을 활용하여 실제 이황화결합 부위를 규명하였다. 또한, 모든 가능한 이황화결합에 대한 위치 확인을 위해, 3가지의 가수분해효소(Asp-N, Chymotrypsin, Asp-N&Chymotrypsin)를 사용하여 총 39번의 LC-MS/MS 분석을 진행하였다(Asp-N: 10회, Chymotrypsin: 10회, Asp-N&Chymotrypsin: 19회). 3가지 가수분해효소를 활용한 이황화결합 분석을 통하여 모든 가능한 이황화결합 부위를 예측할 수 있었다.

본 연구를 통하여 분석된 Asp-N 가수분해효소에서의 이황화결합 분석결과를 Fig. 6A에 나타내었다. Asp-N 유래 이황화결합 분석결과 1개의 Inter-chain과 5개의 Intra-chain의 이황화결합 부위가 규명되었으며, 6개의 이황화결합 부위를 펩타이드 맵핑 분석을 통해 확인하였다(Fig. 6B). 분석된 상세한 이황화결합 정보를 Table 2에 나타내었다.

Fig. 7A에 Chymotrypsin 가수분해효소 유래 이황화결합 분석결과를 나타내었다. Chymotrypsin에 의한 이황화결합 분석결과, 4개의 Intra-chain의 이황화결합 부위가 규명되었으며, Inter-chain 이황화결합 형태는 나타나지 않았다. 규명된 4개의 이황화결합 부위를 펩타이드 맵핑 분석을 통해 확인하였으며(Fig. 7B), 분석된 이황화결합 정보를 Table 2에 나타내었다.

보다 정확한 이황화결합 분석을 위해서, Asp-N&Chymotrypsin 가수분해효소 유래 이황화결합 분석도 함께 수행하였다. Asp-N&Chymotrypsin 가수분해효소 유래 이황화결합 분석결과를 Fig. 8A에 나타내었다. Asp-N&Chymotrypsin에 의한 이황화결합 분석결과, 2개의 Inter-chain과 3개의 Intra-chain의 이황화결합 부위가

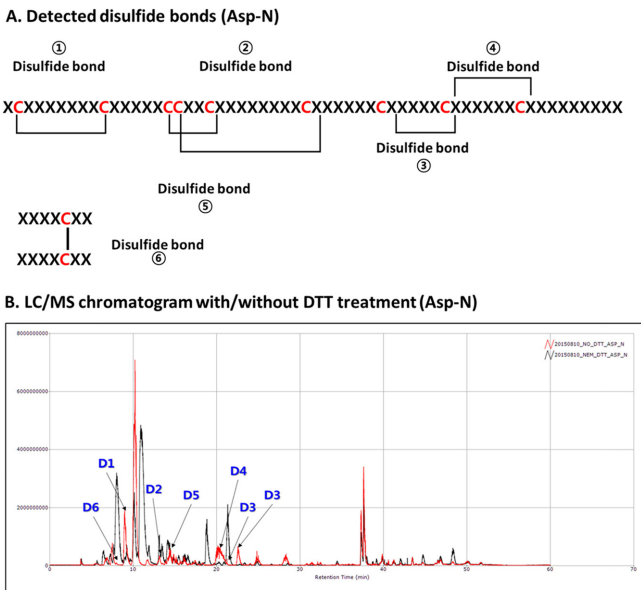


Fig. 6. Identified disulfide bonds of HRPE1 protein in Asp-N enzyme treatment condition. (A) Detected disulfide bond in Asp-N enzyme treatment condition. (B) LC/MS chromatogram with/without DTT treatment conditions.

Table 2. Overall result of identified disulfide bonds in Asp-N, Chymotrypsin, Asp-N&Chymotrypsin enzyme treatment conditions

A. Detected disulfide bonds (Asp-N)									
Frag#	Res#	Disulfide bridge	Amino acid sequence	m/z	Charge	HRPE1			
						m/z	RT	Area	
D1	1-12	C2=C10	XCXXXXXXXXCXX	616.71	2	616.77	9.23	1.56E+07	
D2	13-34	C16=C17=C20=C29	XXXCCXXCXXXXXXXXCXXXXX	615.15	4	615.26	12.43	1.10E+05	
D3	35-44	C36=C42	XCXXXXXCXX	547.19	2	547.20	23.72	2.31E+05	
D3	35-44	C36=C42	XCXXXXXCXX	547.19	2	547.20	22.72	3.80E+05	
D4	37-51	C42=C49	XXXXXCXXXXXXXXCXX	795.31	2	795.31	20.67	3.30E+07	
D5	1-34	C2=C10=C16=C17=C20=C29	XCXXXXXXXXCXXXXCXXCXXXXXXXXXCXXXXX	918.64	4	919.15	13.27	4.87E+06	
D6=6	45-51=45-51	C49=C49	XXXXCXX	732.27	2	732.27	8.63	9.63E+06	
B. Detected disulfide bonds (Chymotrypsin)									
Frag#	Res#	Disulfide bridge	Amino acid sequence	m/z	Charge	HRPE1			
						m/z	RT	Area	
D1	5-22	C10=C16=C17=C20	XXXXXCXXXXCCXXCXX	923.85	2	924.36	12.21	3.79E+04	
D2	5-27	C10=C16=C17=C20	XXXXXCXXXXCCXXCXXXXXXX	810.33	3	811.00	24.06	6.69E+05	
D2	5-27	C10=C16=C17=C20	XXXXXCXXXXCCXXCXXXXXXX	810.33	3	810.67	14.1	1.49E+05	
D3	28-55	C29=C36=C42=C49	XCXXXXXCXXXXCXXXXXCXXXXXX	1006.41	3	1007.09	20.00	1.44E+05	
D4	28-58	C29=C36=C42=C49	XCXXXXXCXXXXCXXXXXCXXXXXXX	1082.77	3	1083.45	19.45	4.96E+06	
C. Detected disulfide bonds (Asp-N&Chymotrypsin)									
Frag#	Res#	Disulfide bridge	Amino acid sequence	m/z	Charge	HRPE1			
						m/z	RT	Area	
D1=1	1-12	C2=C2	XCXXXXXXXXCXX	821.71	3	822.37	17.27	1.62E+06	
D1=1	1-12=1-3	C2=C2	XCXXXXXXXXCXX, XCX	527.90	3	528.24	15.14	1.62E+06	
D2	5-27	C10=C16=C17=C20	XXXXXCXXXXCCXXCXXXXXXX	810.33	3	811.00	23.03	2.02E+06	
D3	28-55	C29=C36=C42=C49	XCXXXXXCXXXXCXXXXXCXXXXXX	1006.41	3	1007.09	28.43	1.67E+05	
D4	37-51	C42=C49	XXXXXCXXXXXCXX	795.31	2	795.24	28.58	7.77E+06	
D5=5	45-51=45-51	C49=C49	XXXXCXX	732.27	2	732.27	16.17	2.89E+06	

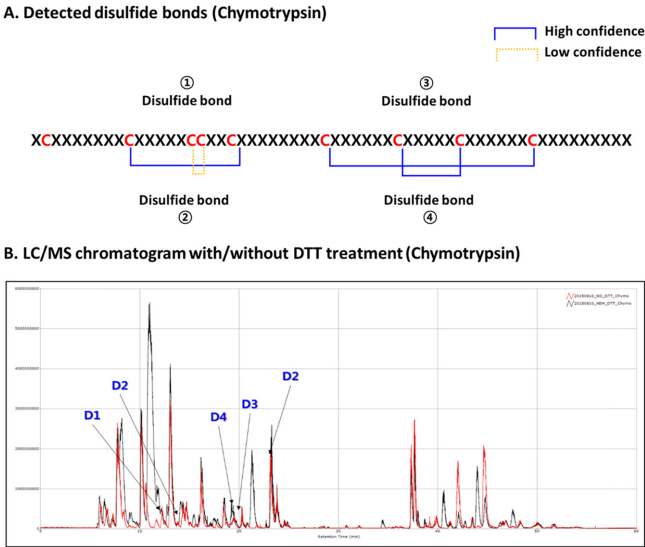


Fig. 7. Identified disulfide bonds of HRPE1 protein in Chymotrypsin enzyme treatment condition. (A) Detected disulfide bond in Chymotrypsin enzyme treatment condition. (B) LC/MS chromatogram with/without DTT treatment conditions.

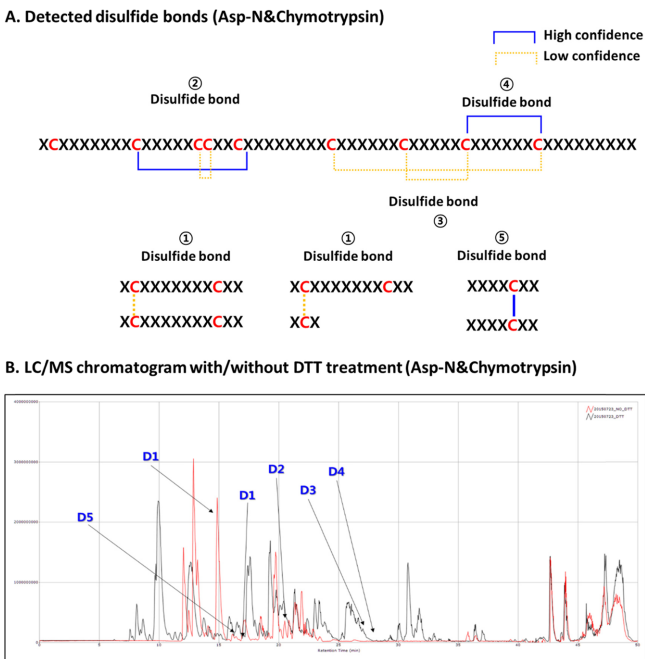


Fig. 8. Identified disulfide bonds of HRPE1 protein in Asp-N & Chymotrypsin enzyme treatment condition. (A) Detected disulfide bond in Asp-N&Chymotrypsin enzyme treatment condition. (B) LC/MS chromatogram with/without DTT treatment conditions.

규명되었다. 분석된 5개의 이황화결합 부위를 펩타이드 맵핑 분석을 통해 확인하였으며(Fig. 8B), 분석된 이황화결합 정보를 Table 2에 나타내었다.

3-6. 이황화결합 분석법의 종합적인 검증

최종 제안된 HRPE1의 이황화결합 부위 분석은 3개(Asp-N, Chymotrypsin, Asp-N&Chymotrypsin)의 가수분해효소에 따른 결

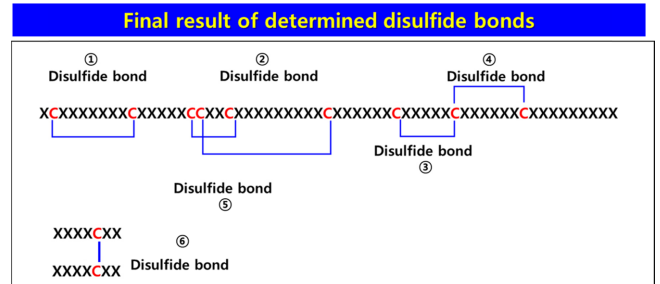


Fig. 9. Final result of identified disulfide bonds for the HRPE1 protein (inter-chain disulfide bonds: 1 and intra-chain disulfide bonds: 5).

과를 바탕으로, 다음의 조건을 만족시키는 이황화결합 부위를 선정하여 최종결론을 내렸다. 우선적으로 이황화결합 분석을 위하여 분석된 아미노산서열(DISULFIND 프로그램) 및 질량분석데이터(PepFinder™ Software) 기반 분석결과를 바탕으로, 3가지 가수분해효소 유래 이황화결합에 대한 분석결과에서 공통적으로 규명된 이황화결합 부위를 우선적으로 선정하였다. 이황화결합에 대한 이론적인 질량 값과 실제 확인된 질량 값과의 차이(Accuracy: 정확도)가 가장 낮은 것을 선정하였다. 이황화결합의 경우, 단백질의 3차원 구조를 형성하는데 매우 중요한 역할을 담당하기 때문에, 이황화결합의 구조적인 유효성여부도 함께 고려하였다. 본 연구를 통해서 최종 제안된 HRPE1의 이황화결합 부위를 그림9에 나타내었다. 이황화결합 분석결과 1개의 Inter-chain과 5개의 Intra-chain 이황화결합 부위가 최종적으로 규명되었다.

4. 결 론

본 연구를 통해 분석된 재조합 단백질의 이황화결합 위치를 확인한 결과 9개의 시스테인에서는 자유-시스테인이 없는 것으로 확인되었으며, 1개의 Inter-chain과 5개의 Intra-chain 이황화결합 부위가 최종적으로 규명되었다. 특히, 본 연구에서는 이황화결합 분석을 위해 자유-시스테인 분석법, 아미노산서열(DISULFIND) 및 질량분석데이터(PepFinder™ Software) 기반 분석법을 적용함으로써 이황화결합의 확실성(Confidence) 및 정확성(Accuracy)에 대한 평가를 수행할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 이황화결합 분석법은 의약품 개발에서의 이황화결합에 대한 효율적인 패턴분석과 관련한 유용한 자료로 활용될 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 오송첨단의료산업진흥재단 신약개발지원센터의 연구장비 및 인력지원을 받아 수행되었습니다. 본 연구에 사용된 휴먼 유래 재조합 단백질(HRPE1)은 아이진(주)에서 제공하였습니다.

References

1. Rietsch, A. and Beckwith, J., "The Genetics of Disulfide Bond Metabolism," *Annu. Rev. Genet.*, **32**, 163-84(1998).
2. Seiwert, B. and Karst, U., "Simultaneous LC/MS/MS Determination of Thiols and Disulfides in Urine Samples Based on Differential Labeling with Ferrocene-Based Maleimides," *Anal.*

- Chem.*, **79**, 7131-7138(2007).
3. Xu, H., Zhang, L. and Freitas, M. A., "Identification and Characterization of Disulfide Bonds in Proteins and Peptides from Tandem MS Data by use of the MassMatrix MS/MS Search Engine," *J. Proteome Res.*, **7**, 138-144(2008).
  4. Yen, T. Y., Yan, H. and Macher, B. A., "Characterizing Closely Spaced, Complex Disulfide Bond Patterns in Peptides and Proteins by Liquid Chromatography/electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, **37**, 15-30(2002).
  5. Yen, T. Y., Joshi, R. K., Yan, H., Seto, N. O. L., Palcic, M. M. and Macher, B. A., "Characterization of Cysteine Residues and Disulfide Bonds in Proteins by Liquid Chromatography/electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, **35**, 990-1002(2000).
  6. John, H. and Forssmann, W.G., "Determination of the Disulfide Bond Pattern of the Endogenous and Recombinant Angiogenesis Inhibitor Endostatin by Mass Spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1222-1228(2001).
  7. Yang C., Weiwei Z., Xufeng Y., Jinfei Y. and Huizhen Z., "Simple synthesis of Biphosphonates with Excellent Flameproofing Properties," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**(2), 187-190(2014).
  8. Zeng, R., Xu, Q., Shao, X. X., Wang, K. Y. and Xia, Q. C., "Determination of the Disulfide Bond Pattern of a Novel C-type Lectin from Snake Venom by Mass Spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 2213-2220(2001).
  9. Jones, M. D., Hunt, J., Liu, J. L., Patterson, S. D., Kohno, T. and Lu, H. S., "Determination of Tumor Necrosis Factor Binding Protein Disulfide Structure: Deviation of the Fourth Domain Structure from the TNFR/NGFR Family Cysteine-Rich Region Signature," *Biochemistry*, **36**, 14914-14923(1997).
  10. Jones, M. D., Patterson, S. D. and Lu, H. S., "Determination of Disulfide Bonds in Highly Bridged Disulfide-Linked Peptides by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Postsource Decay," *Anal. Chem.*, **70**, 136-143(1998).
  11. Debski, J., Wyslouch-Cieszynska, A., Dadlez, M., Grzelak, K., Kludkiewicz, B., Kolodziejczyk, R., Lalik, A., Ozyhar, A. and Kochman, M., "Positions of Disulfide Bonds and N-glycosylation Site in Juvenile Hormone Binding Protein," *Arch. Biochem. Biophys.*, **421**, 260-266(2004).
  12. Tie, J. K., Mutucumarana, V. P., Straight, D. L., Carrick, K. L., Pope, R. M. and Stafford, D. W., "Determination of Disulfide Bond Assignment of Human Vitamin K-dependent Gamma-glutamyl Carboxylase by Matrix-assisted Laser Desorption/ionization Time-of-flight Mass Spectrometry," *J. Biol. Chem.*, **278**, 45468-45475(2003).
  13. Rajesh, T., Park, H. Y., Song, E., Sung, C., Park, S. H., Lee, J. H., Yoo, D., Kim, Y. G., Jeon, J. M., Kim, B. G. and Yang, Y. H., "A New Flow Path Design for Multidimensional Protein Identification Technology Using Nano-liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry," *Korean J. Chem. Eng.*, **30**(2), 417-421(2013).
  14. Lee, I. S., Ko, K. Y., Kim, I. H., "Analysis of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) Separation via RP-HPLC (reversed-phase high-performance liquid chromatography) by the Moment Method and the van Deemter Equation," *Korean Chem. Eng. Res.*, **53**(6), 723-729(2015).