

연/구/동/향

식물 proteome 의 최근 연구동향

부성희*, 피봉관, 전종성
(경희대학교 식물대사 연구센터/생명공학원)

최근 식물의 기능분석을 위한 도구로 proteomics가 활발하게 이용되고 있다. 방대한 식물 유전자 정보의 이용이 가능해지고 이를 기반으로 질량 분석기에 의한 빠르고 정확한 단백질 분석과 예측이 가능해짐에 따라 식물의 proteome 분석은 식물체의 복잡한 기능을 연구할 수 있는 좋은 기술로 인식 되어지고 있다 (Fig. 1). 최근 점점 많은 식물체의 Whole genomes sequences가 완료되고 expressed sequence tag (EST) sequences 이용의 빠른 증가는 식물체의 복잡한 기능을 분석하는데 있어서 이러한 기술이 새로운 장을 열어주고 있다. 물론, sample preparation에 있어서 plant cell walls의 단단함이나 central vacuole에서 secondary compounds가 다량 축적된다는 점 등 직면하고 있는 기술의 한계가 있지만 기술의 진보는 눈 부실만큼 빠르게 진행되고 있다. 초창기 연구에 비해 최근에는 식물체의 각 조직별, 기관별 또는 세포내 소기관의 proteome에 대하여 외부의 환경 변화 등의 자극에 반응하는 단백질들을 찾는 연구들이 이루어지고 있다.

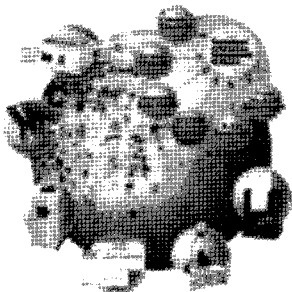


Figure 1. Scheme of proteome analysis

식물의 organs이나 tissues의 단백질 변화의 분석은 식물 발달의 변화를 관찰하거나 환경 자극의 영향을 탐구하는 것 뿐만 아니라 서로 다른 genetic background를 가진 식

물들을 구별하는데도 적절히 이용되고 있다. 식물이 발아하는 사이에 일어나는 단백질의 변화에 대한 연구가 최근에 Arabidopsis에서 실행되었는데 종자에서 약 1300여 개의 단백질들이 발현됨을 밝혔고 그 중 발아하는 동안 발현량이 변한 것은 74개였다. 또한 종자 발아에 있어서 gibberellins (GAs)의 역할을 GA-deficient line과 GA biosynthesis의 inhibitor가 첨가된 wild-type seeds의 단백질 발현의 비교에 의해 연구되기도 하였다. 이 연구는 46개가 넘는 단백질의 변화 중 단 하나만이 GA-dependent하다는 사실로 GA가 germination의 시작단계에서 아주 특이적인 역할을 수행한다는 것을 보여준다. 이러한 연구는 식물이 발아하는 동안 일어나는 복잡한 cellular events의 더 나은 이해를 위한 도구로 proteome 분석의 잠재성을 보여준다. 특히 작물에 적용되었을 경우에 보다 나은 작물을 개발해 내는데 중요한 정보를 제공할 수 있으리라 판단된다.

많은 연구에서 proteome 분석은 mutants와 wild-type 식물들의 단백질 발현을 비교하는 방법으로 돌연변이를 유도하는 유전자를 찾는 일을 해 왔다. 식물 발달에 관련된 Arabidopsis mutant에 대한 연구는 hypocotyl length와 관계 있는 actin isoform을 밝혀 내었고 뿌리에서의 iron 결핍에 대한 식물의 반응을 chloronerva mutant를 이용하여 ascorbate peroxidase와 같은 stress에 관련된 단백질이 유도 된다는 것을 밝혀내기도 하였다.

2-D gel electrophoresis에 의한 단백질 발현의 pattern 분석은 식물의 genetic variability를 평가하는데도 널리 이용되는데 밀접하게 관련된 식물인 밀, 보리, 벼, 옥수수, 그리고 많은 다른 농작물 중에서 성공적으로 구별되었다. 이미지 분석과 데이터의 통계적인 처리를 이용하여 표본식물과 비교 함으로서 각 식물체에 어떠한 유전적 변화가 일어났는지 확인할 수 있다. 이러한 연구들은 보리 종자, 맥아, 밀 grain을 분석할 때 genetic variability를 증명하고 구별하게 하는데 2-DE 기법이 얼마나 유용하게 이용되고 있는지 잘 보여준다.

연/구/동/향

식물의 subcellular proteome 분석

Subcellular compartments의 특이적 기능들이 다양한 proteome의 분석으로부터 가능하게 되었는데, 최근에 cell wall, plasma membrane, mitochondria, endoplasmic reticulum, golgi apparatus, 그리고 chloroplast 등에서 많은 결과들을 얻어내었다. 이 과정에서 membrane proteins에 대한 동정이 다소 힘든 점이 있었으나, 다양한 detergents의 적용과 다양한 방식의 IEF 기술의 발전으로 대부분의 문제를 빠르게 해결하고 있다 (Fig. 2).

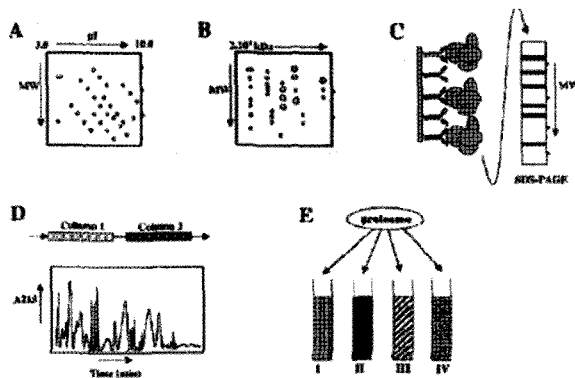


Figure 2. Strategies of proteome identification.

- A, Denaturing 2-D gel electrophoresis.
- B, Non-denaturing 2-D gel electrophoresis.
- C, Immuno-affinity chromatography followed by SDS-PAGE.
- D, Multi-dimensional chromatography.
- E, Organic solvent fractionations of hydrophobic proteins.

다른 소 기관에서처럼 mitochondrial proteome은 2-DE를 이용하여 연구되었는데, plant mitochondria의 proteome 연구에서는 50여 개의 단백질이 분석 되었는데 약 20% 정도가 기존에 알려지지 않은 단백질이었다.

Chloroplasts의 경우 thylakoid의 단백질 구성과 envelope, 그리고 몇몇의 chloroplast protein complexes 등에 대한 분석이 진행되었다. Edman sequencing과 MALDI-TOF MS의 조합은 thylakoid membrane fraction과 luminal compartment의 분석을 가능케 하였는데 완두의 엽록체에서 분석된 60개 이상의 단백질들

중 lumen proteins의 절반에 달하는 수가 translocation pathway의 twin-arginine motif를 포함하고 있다는 것을 보여주었다. 이러한 결과는 transit peptides의 예측을 가능케 하는 새로운 정보를 제공하였는데 최근에는 Arabidopsis와 시금치의 thylakoid lumen proteins을 비교하는 방법을 이용하여 Arabidopsis에서 luminal precursors의 절반이 translocation twin-arginine motif를 포함하고 있음을 보여주었다.

식물 proteome 분석의 중요한 문제는 envelope부터의 hydrophobic proteins의 분석이다. 최근에 chloroform/methanol extraction을 이용하여 SDS-PAGE와 MS analysis를 수행하여 시금치에서 최초로 40개 이상의 protein을 분석하였고 Arabidopsis에서도 비슷한 접근법으로 새로운 envelope proteins을 포함한 약 60개의 단백질을 분석하였다

Mitochondria와 chloroplast의 연구에서 보는 바와 같이 organelle proteomics가 식물의 subcellular compartment를 구성하는 대부분의 단백질을 곧 식별 가능하게 할 것이다.

Proteomic analysis of trees

그 동안 목본 식물 (woody plants)의 genomic와 proteomic 연구는 DNA와 단백질 분리의 어려움으로 인해 어려움이 많았다. 이유는 식물에서 polysaccharides, pigments 그리고 phenolics 같은 보통의 interfering substances가 특히 나무의 lignified tissues에 많았기 때문이다. 그럼에도 불구하고 2-DE에 의한 polypeptides의 분리와 일반적인 기술을 이용한 protein identification은 지난 10년간 나무에 다양한 적용을 하며 연구자들에 의해 이용되었다. 최근에 중요한 두개의 모델이 제안되었는데 angiosperms인 poplar와 gymnosperms인 pine이 그것이다. Large-scale EST sequencing projects는 poplar와 loblolly 그리고 maritime pines 에서 시작되었다. 서로 다른 woody tissues로부터의 ESTs databases와 정보는 internet으로 접근 가능하다 (<http://www.biochem.kth.se/>)

연/구/동/향

PopulusDB(<http://pinetree.ccg.umn.edu>;<http://cbl.labri.fr/outils/SPAM/index.php>). Woody plant tissues로부터의 EST databases의 확립은 유전자 발현과 함께 xylem differentiation, embryogenesis 혹은 tree growth와 같은 나무에서의 중요한 성장 발달과정을 연구하는데 있어 중요한 정보를 제공할 것이다. 특히 xylem의 단백질들은 나무의 성장과 wood formation에 중요한 조직으로 최근 internal peptide microsequencing에 의해 분석되어 internet의 proteomic database에서 접근가능하다 (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/2D>).

Large-scale EST sequencing, gene expression profiling, 그리고 proteomic approaches같은 functional genomic approaches는 나무에서 몇몇의 중요한 process를 포함하는 유전자나 단백질을 발견하게 하였다. 비록 functional genomics에서의 이러한 새로운 발전이 몇몇 나무 모델에 제한되지만 큰 상업적인 관심으로 인해 다른 woody plants로 빠르게 확장되어 가고 있다. International consortium은 이 project를 발전시키기 위해서 2003년 말에 첫 번째 모임을 구성하였다 (<http://bahama.jgipsf.org/prod/bin/populus/whitepaper.populus.cgi>; <http://genome.jgi-psf.org/poplar/poplar.home.html>). 더불어 poplar에서 Agrobacterium을 이용한 정형화된 transformation protocols이 가능해졌고 이 기술의 빠른 진전은 최근 몇 년 comifers에서도 보고되어 transgenic trees의 기능적인 연구도 최근 가능하게 되었다. Woody plants에서 얻어진 결과와 Arabidopsis의 functional genomics 연구로부터 얻어진 생물학적 정보들은 식물의 구조와 기능에 대한 분자생물학적 이해를 향상시키는 물론이거니와 이들을 이용한 산업적 발전에 지대한 영향을 미칠 것이다.

식물 proteomics의 기술진보

식물체의 proteomics는 그 분석에 있어서 기술적 제한이 있었다. 그러나 최근 새로운 방법들이 빠르게 고안되면서 발전하고 있다. 현재는 기술의 발전으로 향상된 resolution과 보다 나은 quantification, sample prefractionation,

narrow pH gradients를 사용하고 있으며, larger gel-formats 2-DE, 그리고 새로운 staining과 labelling methods 등의 고안에 초점이 맞추어져 있다. Difference gel electrophoresis (DIGE)는 prelabelling technique으로서 서로 다른 Cy dyes를 이용하여 gel 간의 차이를 최소화하여 비교하는 획기적인 기법이며 이를 통해 2-DE 기법을 이용한 정량방법이 더욱 신뢰도가 높아지기도 했다. (Fig. 3).



Figure 3. 2-D Fluorescence difference gel electrophoresis (DIGE)

Liquid chromatography (LC)는 protein separation에 있어서 2-DE 기법을 대체할 수 있는 기법으로 생각되고 있는데, 이를 이용하여 low-abundant proteins의 분석이 용이하게 이용되고 있다. LC는 LC mass spectrometer (LC-MS)와 연계하여 단백질을 분석하는데 사용되고 있는데, isotope-coded affinity tags (ICATs)을 이용하여 protein expression analysis에 이용되기도 한다. ICAT-based LC-MS는 적은양의 단백질을 분석하기에 용이하며 단백질의 modification 연구에 널리 이용되고 있다. Multidimensional protein identification technology (MudPIT)이라는 방식이 고안 되었는데, MudPIT은 복잡한 단백질체의 조합을 전통적인 방식의 2-DE보다 더욱 잘 분리해내는 장점이 있다. Multiprotein complexes components와 protein-protein interaction의 연구는 cellular processes를 이해하는데 매우 중요한 일인데, 이는 전통적인 two-hybrid systems를 사용하던 데서 protein chips이나 tandem-affinity purification (TAP)-MS를 이용하여 분석을 시도하고 있다. 이는 이미 yeast

연/구/동/향

proteome을 분석하는데 이용되었는데, 여기서 589 multiprotein assemblies를 분석하기도 하였다. 이뿐만 아니라 Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 이라는 기법을 통해 fluorescent tag 된 단백질을 이용하여 *in vivo* 상태에서 microscopy를 이용하여 interacting proteins을 관찰하는 획기적인 발전이 있기도 하였다.

References

- [1] Canovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J. et al., *Proteomics* 2004, 4, 285-298.
- [2] Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M. et al., *Plant Physiol.* 2002, 129, 823-837.
- [3] Maltman, D. J., Simon, W. J., Wheeler, C. H., Dunn, M. J. et al., *Electrophoresis* 2002, 23, 626-639.
- [4] Schubert, M., Petersson, U. A., Haas, B. J., Funk, C. et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 8354-8365.
- [5] Ferro, M., Salvi, D., Riviere-Rolland, H., Vernat, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 11487-11492.
- [6] Tyers, M., Mann, M., *Nature* 2003, 422, 193-197.
- [7] Aebersold, R., Mann, M., *Nature* 2003, 422, 198-207.
- [8] Phizicky, E., Bastiaens, P. I. H., Zhu, H., Snyder, M. et al., *Nature* 2003, 422, 208-215.
- [9] Gorg, A., Boguth, G., Kopf, A., Reil, G. et al., *Proteomics* 2002, 2, 1652-1657.
- [10] Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Muller, D. et al., *Proteomics* 2002, 2, 127-134.
- [11] Patton, W. F., *J. Chromatogr. B* 2002, 771, 3-31.
- [12] Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J. et al., *Nat. Biotechnol.* 2002, 20, 301-305.
- [13] Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P. et al., *Nature* 2002, 415, 141-147.
- [14] Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M. et al., *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 89-92.



본 학회는 Genomics, Proteomics, Bioinformatics 분야의 전문가들로 구성된 국내 유일의 유전체 연구 전문학회입니다. 본 학회에서는 귀사에서 취급하고 있는 다양한 제품과 기술들을 본 학회의 활동을 통하여 국내의 연구자들에게 널리 알림으로써 귀사가 일의 번창하시기를 기원합니다. 따라서 2003년도 본 학회를 통한 홍보방법 및 규정을 알려드리오니 적극 활용하시기 바랍니다.

1) 소식지 및 학회지 광고 (1년 단위 : 4회 게재)

광고크기 (A4기준)	천연색광고가격 (만원)	흑백광고가격 (만원)
책자 맨 뒷면	360만원	
책자 앞장의 안쪽면과 맨 뒷면의 안쪽	320만원	
간지	280만원	200만원

2) 학술대회(8월 개최) 부스 광고

- 150만원/1부스 (일반학술대회의 부스크기와 동일)
- 초록집 광고 : 표지 - 1,000,000 원
내지 - 800,000 원

3) 학회 홈페이지 www.kogo.or.kr 배너 광고

- 월 20만원 (결제 방식은 업체 결정)

4) 패키지 광고

- 부스+소식지+학회지 = (250만원/흑백), (310만원/천연색)
- 부스+소식지 or 학회지 = (200만원/흑백), (240만원/천연색)

5) 2004년 워크샵 개최

- 자세한 일정은 추후 안내

<문의>

전화 : 02-877-9398 / 팩스 : 02-482-9392

E-mail : kogo@kogo.or.kr