

## 동위원소치환법을 이용한 프로테옴 정량분석

김진영  
한국기초과학지원연구원

**세포** 혹은 조직에서 어떤 단백질들이 발현되며 어떤 변화를 보여주는지 종합적으로 연구하는 분야가 프로테오믹스(Proteomics)이다. 프로테오믹스는 90년대 이후 질량분석법의 획기적 발전과 더불어 단백질들의 아미노산 서열에 대한 데이터베이스가 구축되기 시작하고 이로 인한 유전적 정

보의 활용이 가능해지면서 시작되었다.

질량분석법을 이용한 프로테옴 분석의 가장 큰 장점은 단백질의 확인 뿐 아니라 동위원소 치환법(stable isotope coding)을 이용하여 정량분석까지 동시에 할 수 있다는 것이다. 분자량만 다르고 화학적으로는 동일한 동위원소를 사용하여 질량 값의 차이를 두고 비교하는 방법으로 두 펩타이드의 상대적 감도의 비(isotope ratio)는 프로테옴 시료에서 단백질 발현 차이를 나타낸다(Julka. et. al., 2004, J. Proteome. Res., 3, 350-363). 이 방법은 2DE와 단백질 염색법 또는 항원항체반응을 이용한 정량분석보다 더 광범위하게 사용될 수 있다.

동위원소치환법을 이용한 프로테옴 정량분석을 위해서는 우선 동위원소를 붙여주거나(stable isotope tagging), 동위원소로 치환된 단백질 또는 펩타이드 시료를 준비해야 한다. 현재, 동위원소로 치환된 화합물을 화학적 반응을 통해 단백질 혹은 펩타이드에 붙여주는 *in-vitro* 방법과 동위원소로 치환된 media를 이용하여 cell을 배양함으로써 동위원소가 포함된 단백질을 얻도록 하는 *in-vivo* 방법이 주로 사용되고 있다(Steen et. al., 2002, Trends Biotechnol., 20, 361-363).

Isotope coded affinity tag(ICAT)는 *in-vitro* tagging을 이용하는 가장 잘 알려진 프로테옴 정량분석법이다(Gygi et. al, 1999, Nat. Biotechnol., 17, 994-999). 동위원소로 치환된 부분과 친화성 칼럼에 결합할 수

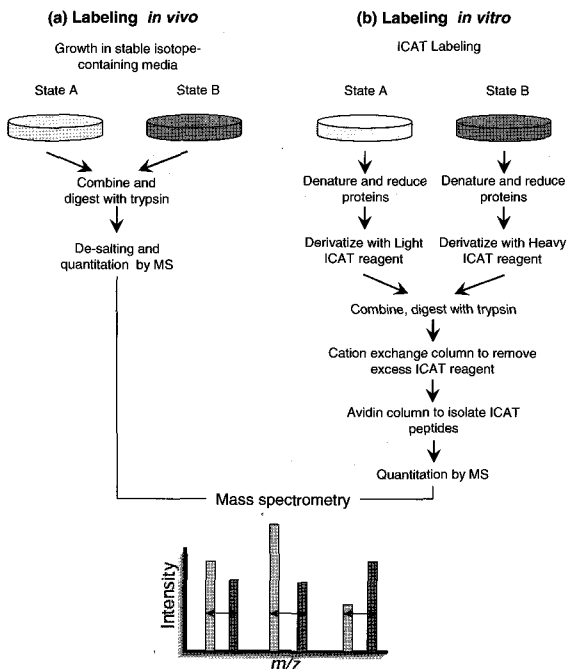


그림 1. A schematic of in-vivo and in-vitro methods used to label proteins for relative quantitation(Julka et. al., 2004, J. Proteome. Res., 3, 350, and Aebersold et. al, 2003, Nature, 422, 198)

있는 구조를 가진 화합물을 단백질의 특정 부분에 반응하게 하고, 선택적으로 농축 분리한 후 LC/MS/MS를 이용하여 분석한다. 단백질 또는 펩타이드를 대상으로 하는 carboxyl group(C-terminus, glutamic acid, aspartic acid), amino group(N-terminus, lysine), thiol group(cysteine), phosphate ester group, N-linked carbohydrate 등에 선택적으로 작용하는 동위원소 tagging법을 이용한 프로테오믹스 정량분석 방법들이 발표되고 있다 (Julka. et. al., 2004, J. Proteome. Res., 3, 350-363). 최근, 펩타이드의 amine group에 isobaric tagging reagent를 반응시키고, MS/MS 실험에서 얻어지는 특정 분해이온의 비를 확인함으로써 4개의 프로테오믹스 시료를 동시에 정량적으로 비교할 수 있는 방법이 소개되었다(Ross et. al, 2004, Mol. Cell Proteomics, 3, 1154-1169). 이 방법은 가수분해 되어 생성된 모든 펩타이드에 대해 적용할 수 있으므로 분석결과의 신뢰도를 증가시키며 수식화된 단백질에 대해서도 정량적인 정보를 줄 수 있다. 그러나 이러한 화학적 반응을 통한 *in-vitro* 동위원소 tagging법은 반응과정이 복잡하고 정제과정이 필요한 것이 단점이다.

*In-vivo* 동위원소치환법의 경우 SILAC(stable isotope labeling by amino acids in cell culture) 또는 AACM(amino acid coded mass tagging)으로 알려져 있는데(Ong. al, 2003, J. Proteome. Res., 2, 173-181), <sup>15</sup>N enriched media 또는 <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N을 포함하는 amino acid media에서 세포를 배양하는 방식으로 동위원소로 치환된 단백질을 만든다(Krijgsveld et. al, 2003, Nat. Biotechnol., 21, 927-931). 과정이 복잡하지 않고, 배양단계 이후 단백질 분리, 정제를 포함한 모든 프로테오믹스 분석을 동일하게 진행할 수 있는 것이 장점이지만 배양이 가능한 시료의 경우에만 적용할 수 있는 방법이다.

한편 동위원소 치환법을 이용하여 표적 단백질에 대한 절대량을 측정하는 방법(absolute quantification analysis: AQUA)도 발표되고 있다. 여기서는 표적 단백질에서 유도되는 펩타이드를 대상으로 동위원소로 치환된 펩타이드를 합성하여 일정량을 내부표준물질

로 첨가하여 정량적으로 분석하는 방법을 이용한다 (Gerber et. al., 2003, PNAS, 100, 6940-6945). 최근 Ishihama와 Oda 등은 *in-vivo*로 배양된 동위원소치환 단백질을 내부표준물질로 사용하여 mouse brain 조직에서 단백질의 양을 상대적으로 비교할 수 있을 뿐만 아니라 절대적으로 확인하는 방법을 발표하였다(그림 2. Ishihama et. al., 2005, Nat. Biotechnol., 23, 617-621).

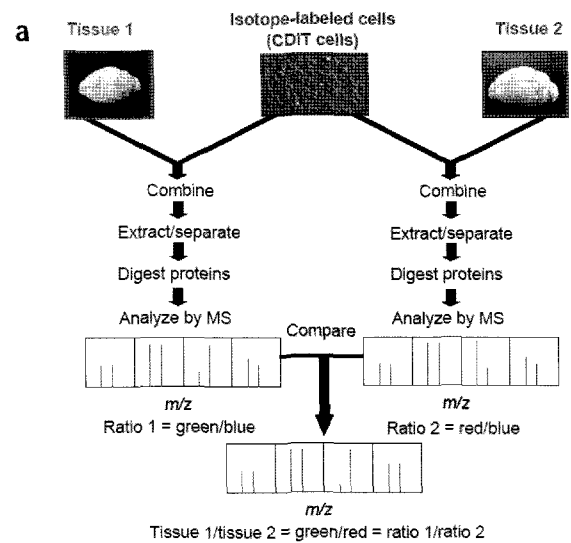


그림 2. Strategy of quantitative mouse brain proteomics using CDITs (culture-derived isotope tags)(Ishihama et. al., 2005, Nat. Biotechnol., 23, 617-621).

다양한 동위원소치환법을 이용한 상대적 또는 절대적 프로테오믹스 정량분석은 전기영동법, 다차원 LC 등의 단백질 복합체 분리기술과 생물 정보학의 도움이 뒷받침 되면서 초고속 프로테오믹스 정량분석을 가능하게 하였고, 이로 인해 바이오마커를 찾거나, 세포나 조직에서 발견되는 단백질들을 종합적으로 분석하고 연구할 수 있는 능력을 보여주었다(Pan et.al., 2005, Mol. Cell Proteomics, 4, 182-190). 그러나 광범위한 농도 범위에서 다양한 형태의 단백질의 변화를 확인하기에는 아직 부족하다. 앞으로 정량적으로 분석 가능한 프로테오믹스의 범위를 더 넓힐 수 있는 방향으로 프로테오믹스 정량분석법 개발의 요구는 계속될 것이다.