

## 세포내 총체적인 인산화 펩타이드 및 인산화 위치 규명을 위해 질량분석기 전 단계의 C4 및 양이온 교환수지 칼럼 이용 방법의 비교

김혜정 · 백문창<sup>#</sup>

경북대학교 의과대학 분자의학교실 및 세포기질연구소  
(Received March 25, 2015; Revised May 21, 2015; Accepted May 21, 2015)

### A Comparison between C4 and Cation-exchange Columns as a Pre-separation Method for Mass Spectrometric Analysis to Characterize a Global Identification of Phosphopeptides and Phosphorylation Sites

Hye-Jeong Kim and Moon-Chang Baek<sup>#</sup>

Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Cell and Matrix Research Institute, Kyungpook National University, 101 Dongin-dong, Jung-gu, Daegu 700-422, Korea

**Abstract** — Protein phosphorylation is one of most important post-translational modifications (PTMs) and plays an important role in regulation of protein function. Here we develop a method for a global identification of phosphopeptides and phosphorylation sites using nano-LC MS/MS. We compared two separation methods, C4 and strong cation ion exchange (SCX). Before phosphopeptides enrichment with TiO<sub>2</sub>, total proteins from Rat 1 cells have been separated using C4 column or tryptic peptides of proteins from the cells have been separated using SCX column. Finally, we have detected 52 phosphorylation sites on 41 proteins from SCX method and 375 phosphorylation sites on 252 proteins from C4 method, and determined the function and localization of identified phosphoproteins using DAVID software. In particular, we showed new phosphorylation sites from membrane proteins related to various cell signaling mechanisms. This method may contribute to study global signal networks induced by various signals including ligands and drugs.

**Keywords** □ phosphopeptide, mass spectrometry, strong cation ion exchange, C4 column, TiO<sub>2</sub>

단백질 인산화는 가역적인 반응으로, 세포 신호 전달, 이동, 세포내 정보 교환, 생존, 대사, 항상성 등 대부분의 세포 반응에 관여하는 주요 조절 기전이다.<sup>1,3)</sup> 단백질 인산화 연구에서 중요한 부분중의 하나로써, 인산화가 일어난 단백질의 아미노산 위치를 찾는 것은 여러 가지 연구에 도움을 준다. 하지만, 이 연구가 중요함에도 불구하고, 여전히 단백질 내 인산화 위치를 찾는 연구는 어려움이 있다.

최근에 포스포 프로테오믹스(phosphoproteomics) 분야가 각광

을 받기 시작했다.<sup>4,5)</sup> 질량분석기를 이용하여 인산화 위치를 한꺼번에 찾는 연구 분야이다. 질량 분석기로 분석하기 전에 인산화 펩타이드를 우선 분리 농축하는 것이 중요하다. 인산화 펩타이드를 농축하는 방법은 여러 가지가 있는데, 예를 들어 화학 반응을 이용해서 인산화기를 변형시키는 화학적인 방법과<sup>6)</sup> 인산화 잔기에 친화성을 갖는 금속 이온을 이용하는 방법<sup>7-10)</sup>들이 있다. 화학반응을 이용하는 방법은 아주 선택적인 반면, 부반응과 재현성이 떨어지는 단점이 있다. 따라서 Ga(III), Fe(III) 등을 이용한 IMAC 방식이 주로 이용된다.

최근에는 티타늄 다이옥사이드(TiO<sub>2</sub>)를 이용한 크로마토그래피법이 IMAC과 함께 이용되고 있다.<sup>11-13)</sup> 이 방법은 아주 간단하고 쉽게 진행할 수 있는 장점이 있다.

질량분석기는 단백질을 동정하는 데 가장 강력한 기술 중의 하나로 떠오르고 있고, 더불어, 이는 단백질 인산화와 같은 번역

#### <sup>#</sup>Corresponding Author

Moon-Chang Baek  
Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University, 101 Dongin-dong, Jung-gu, Daegu 700-422, Korea  
Tel.: 053-420-4948 Fax.: 053-426-4944  
E-mail: mcbaek@knu.ac.kr

후 수식(post translational modification)을 밝히는 데 아주 중요한 역할을 하고 있다.<sup>14)</sup> 질량분석기를 이용하여 인산화 펩타이드를 동정하는 동시에 인산화 위치를 동시에 찾아내는 것이다.

세포내의 모든 단백질의 인산화 위치를 한꺼번에 분석하는 것은 신호전달반응을 한꺼번에 알아내는 아주 혁신적인 방법이다.<sup>15-17)</sup> 하지만, 세포내에 있는 많은 인산화 펩타이드를 한 번의 질량분석기 분석에 의해 모두 동정하기는 어렵다. 따라서, 세포내의 단백질들을 여러 가지 칼럼을 이용하여 분리한 후, 각 분획들을 분석하는 방법이 필요하다.

본 연구에서는 Rat 1 세포로부터 단백질들을 얻은 후, 이들 단백질을 C4 역상 칼럼(reverse phase chromatography) 또는 트립신에 의해 절단된 펩타이드를 양이온 교환(strong cation exchange chromatography, SCX) 칼럼을 이용하여 분리하였다. 그 후, 각 분획을  $TiO_2$ 를 이용하여 인산화 펩타이드를 분리 농축한 후, 각각을 나노 초고성능 액체 크로마토그래피(Nano-Ultra Performance Liquid Chromatography) 질량분석기(Nano-Electron Spray Ionization Quadruple-Time Of Flight Mass spectrometry)를 이용하여 분석하였다.

## 실험방법

### 세포 배양 및 단백질 추출

Rat 1 세포는 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에서 5%  $CO_2$ 를 함유하는 37°C 항온기에서 배양하였다. 세포가 97% 가량 자랐을 때, 0.1 mM ammonium bicarbonate 및 phosphatase inhibitor cocktail을 포함한 완충액에서 분쇄기를 이용하여 세포를 파쇄시켰다. 이들을 원심분리(4,000 g, 15 min, 4°C)하여 깨지지 않은 세포들을 제거하고, 상등액을 얻은 후, 이를 스피ن 필터(0.22  $\mu$ m)를 이용하여 나머지 작은 불순물들을 제거하였다.

### FPLC 시스템을 이용한 두 가지 칼럼(SCX와 C4)에 의한 분리

Rat 1 세포에서 얻어진 단백질을 AKTA FPLC system(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 이용하였다. C4 역상 칼럼(4.6 mm×250 mm)을 이용하였고, 분석 조건은 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 포함하는 0% acetonitrile(ACN)에서 60% ACN까지 80분 동안 분석하였고, 용매는 분당 0.3 ml로 흘러 보냈다. UNICORN control software(GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 이용하여 조정된 결과를 얻었다. UV 흡광도를 기준으로 하여 여러 개의 분획들을 합쳐서 총 9개의 시료를 만들었다. 펩타이드 분리를 위해, 강 양이온교환수지의 경우 RESOURCE S 칼럼(6.4 mm×30 mm)을 이용하였고, 분석 조건은 인산완충액(pH 3.0)를 시작으로 NaCl이 1 M이 될 때까지 20분 동안 분석하였고, 용매는 분당 1 ml로 흘러 보냈다. 마찬가지로 UV 흡광도를 기준으로 하여 여러 개의 분획들을 합쳐서 총 16개의 시료를 만들었다.

### FPLC 분획들에 존재하는 단백질의 트립신 절단

FPLC를 통해 분리된 분획들은 감압 건조기(speed vac. dryer)를 이용하여 건조시킨 후, 50 mM ammonium bicarbonate를 넣어 재 용해시켰다. 이 용액을 10 mM dithiothreitol(DTT)로 56°C에서 20분간 환원을 시킨 후에, 100 mM iodoacetamide(IAA)를 이용하여 암조건에서 20분간 처리하여 알킬화를 시켰다. 이어서 트립신(Promega, Madison, WI, USA)을 넣어 37°C에서 12 시간 반응 시킨 후 감압 건조기에서 건조시켰다.

### $TiO_2$ 를 이용한 인산화 펩타이드의 농축

기존에 인산화 펩타이드 농축을 위해 먼저 Top Tip  $TiO_2$  (Glygen, Columbia, MD, USA)을 20  $\mu$ l의 3 g/l DHB를 포함한 80% ACN/0.1% TFA, 암모니아수를 포함한 40% ACN(pH 10.5), 0.1% TFA 완충액으로 각각 씻어준 후 마이크로칼럼에 로딩하고, 절단된 펩타이드를 30 g/l DHB를 포함한 80% ACN, 0.1% TFA 완충액에 녹여 resin과 상온에서 한 시간 정도 결합을 시킨다. 그 다음 10% ACN을 포함한 in 0.1% TFA, 80% ACN, 0.1% TFA로 각각 세척하고 암모니아수를 포함한 20% ACN(pH 10.5), 암모니아수를 포함한 40% ACN(pH 10.5)로 용출한 다음 0.1% formic acid를 첨가하여 산성화시켰다.

### 나노 초고성능 액체 크로마토그래피(Nano-Ultra Performance Liquid Chromatography)

모든 시료는 C18 나노칼럼(75  $\mu$ m id, 250 mm length, 1.7  $\mu$ m particle size, Waters Corporation, Milford, MA)으로 분리하였으며, A 용액(0.1% formic acid 수용액)과 B 용액(0.1% formic acid를 포함한 ACN)의 농도구배에 따라 분리하였다. 각 용액들은 분당 0.3  $\mu$ l의 유속으로 1% B 용액에서 5% B 용액(5분)으로, 후에 25% B 용액(45분), 60% B 용액(95분), 85% B 용액(95~100분) 차례로 증가시킨 후 다시 처음의 농도인 1% B 용액(100~105분)으로 흘러주었다.

### 질량분석기

분석은 nanoUPLC와 연결된 nano-ESI quadrupole TOF 질량분석기를 사용하여 이루어졌다(Q-TOF Premier, Waters). 모든 분석은 양이온 모드로 분석하였다. 각각의 이온들은 순차적으로 Z 형태의 이온화 부분을 통해 질량 분석기 내부로 들어간다. 들어간 이온은 사극자에 도달하여 MS scan을 통해 선구 이온(precursor ion)의 m/z를 확인한다. 사극자에는 직류전하와 라디오 전자기파가 동시에 흐르게 되는데 양전하를 띤 펩타이드 이온들은 사극자 내의 전자기장 내에서 회전하며 이동하는데 이를 바탕으로 각 이온을 정렬하여 선구 이온의 m/z를 얻을 수 있다. 데이터는 충돌관(collision cell)에서 낮은 에너지에서 높은 에너지로 주기적으로 충돌 에너지를 변환시킬 때 사극자에서 모든 이

온을 방출하게 되는 MS<sup>E</sup>(Expression) mode로 받아졌다. 1초 간격으로 스캔하여 MS spectra는 m/z 50에서 m/z 1990까지 얻었다. Mass의 정확도는 LockSpray에서 reference인 GFP(Glu-Fibrinopeptide B, Sigma)를 이용하여 30초 간격으로 스캔 함으로써 유지하였다.

**데이터 변환**

질량분석기로 얻은 데이터는 Mascot Distiller(Matrix Science; version 2.3.2, Boston, MA)를 이용하여 피크 리스트(mgf 파일)로 변환하였다. Mgf 파일을 Mascot(Matrix Science; version 2.2.1, Boston, MA) 프로그램을 이용하여 단백질을 동정하였다. 이때 rat 단백질 분석을 위해 IPI rat 데이터베이스(version 3.70; 39,579 sequences; 20,816,731 residues)를 사용하였다. 단백질 동정을 위한 파라미터로는 fixed modification에 carbamidomethyl C, variable modification에 oxidation M을 선택하였고 트립신 missed cleavage는 2개, 이온 허용 한계는 0.1 Da으로 설정하고 분석결과는 >95%의 정확도를 가지는 2개 이상의 펩타이드로부터 얻어진 단백질을 최종 결과로 얻었다. 또한 질량분석기 분석을 통해 단백질을 DAVID 소프트웨어(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/conversion.jsp>)를 이용하여 어떠한 세포내 위치 카테고리 및 생물학적 작용 카테고리에 속하는지 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**표준 단백질을 이용하여 TiO<sub>2</sub> 방법에 의한 인산화 펩타이드 농축방법 예비 실험**

본 연구는 Rat 1 세포로부터 단백질을 얻은 후에, 이들 중에서 인산화되어 있는 펩타이드의 동정 및 인산화 위치를 대량으로 밝혀내는 방법을 확립하는 것을 목표로 한다.

대량으로 인산화 위치 규명하기 전에, 표준 인산화 단백질인

α-casein을 이용하여 예비 연구를 진행하였다. 인산화 펩타이드를 선택적으로 농축하는 방법은 여러 가지 알려져 있다. Ga(III), Fe(III) 등을 이용한 IMAC 방법과 TiO<sub>2</sub> 방법이 잘 알려져 있고, 최근에는 Sequential elution from IMAC(SIMAC)과 칼슘을 이용한 침전 방법<sup>10</sup>까지 알려져 있다. 이 중에서 본 연구실에서 잘 정립된 TiO<sub>2</sub>를 이용하여 인산화 펩타이드를 농축하는 방법을 이용하였다.

카제인(casein)을 트립신으로 절단 한 뒤에 이들 펩타이드를 건조시킨 후, TiO<sub>2</sub> 로딩 버퍼(loading buffer)로 녹이고, TiO<sub>2</sub> resin과 반응시킨 후에 인산화되지 않은 펩타이드를 제거하고, 인산화 펩타이드만을 용출한 후, 이를 질량분석기를 이용하여 분석하였다.

분석결과, 총 이온 크로마토그램(total ion count)를 얻었고, 이를 noise peak을 제거하고 실제 count만을 보여주는 BPI(base peak intensity)를 얻었다. 이를 PLGS 2.2.5 소프트웨어를 이용하여 pkl file을 얻고, 이를 Mascot search를 통하여 인산화 펩타이드들을 동정하게 되었다. 결과에서 보이는 것처럼 기준에 알려진 모든 인산화 위치를 확인할 수 있었고, α- 및 β-카제인에 존재하는 인산화 펩타이드 및 인산화 위치를 Table I에 보였다. 이 결과는 TiO<sub>2</sub>를 이용한 인산화 펩타이드의 농축과 질량분석기를 통한 인산화 펩타이드 및 인산화 위치 동정하는 방법이 효과적으로 진행되고 있음을 예비 실험으로 잘 보여주고 있다.

**C4 칼럼 및 양이온 교환 수지를 이용한 분리**

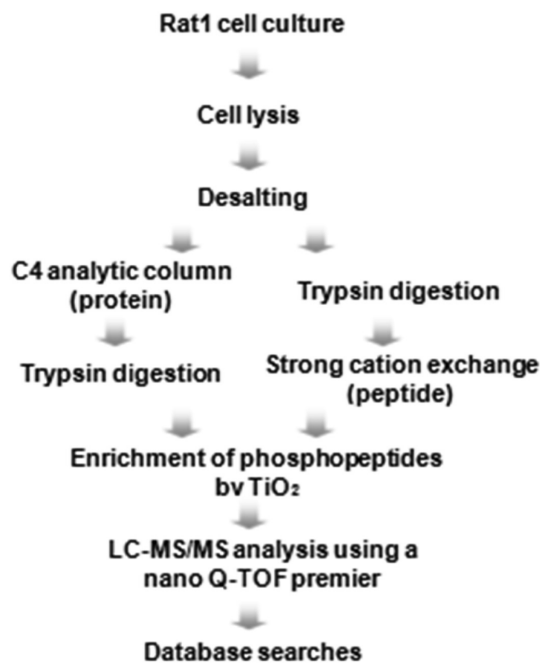
세포내에는 수 많은 다른 인산화 단백질들이 존재하기 때문에 이를 한번의 질량분석기 분석으로 많은 인산화 위치를 찾는 것은 어렵다. 따라서, 질량분석기로 분석하기 이전에 이들을 분획하는 것이 요구된다.

Nano-LC-MS/MS를 이용하여 인산화 펩타이드를 분석하게 되는데, 이때 이용되는 nano-LC는 C18 역상 성질을 가지고 있다.

**Table I** – Identification of phosphopeptides from casein by TiO<sub>2</sub> method

Protein (Swiss-Prot) <sup>a</sup>	Start	Ent	Peptide sequence	Number of phosphate group	(M+H) <sup>+</sup> (Da)
Alpha-S1-casein	58	73	DIGSE <u>STED</u> QAMEDIK	1	1847.7438
Alpha-S1-casein	58	73	DIGSE <u>STED</u> QAMEDIK	2	1927.711
Alpha-S1-casein	74	94	QMEAE <u>SIS</u> SSSEIIVPNSVEQK	2	2497.428
Alpha-S1-casein	74	94	QMEAE <u>SIS</u> SSSEIIVPNSVEQK	3	2561.133
Alpha-S1-casein	74	94	QMEAE <u>SIS</u> SSSEIIVPNSVEQK	5	2721.348
Alpha-S1-casein	52	73	VNELSKDIGSE <u>STED</u> QAMEDIK	2	2598.0684
Alpha-S1-casein	52	73	VNELSKDIGSE <u>STED</u> QAMEDIK	3	2693.9875
Alpha-S1-casein	121	134	VPQLEI <u>VPNS</u> AEER	1	1660.7983
Alpha-S2-casein	141	151	EQLSTSEENSK	1	1331.5355
Alpha-S2-casein	153	164	TVDMESTEVFTK	1	1642.4973
Alpha-S2-casein	61	85	NANEEY <u>SIG</u> SSSEESAEVATEEVK	3	2928.1057
Alpha-S2-casein	61	85	NANEEY <u>SIG</u> SSSEESAEVATEEVK	4	3008.0476
Beta-casein	33	48	FQSEE <u>QQTE</u> DELQDK	1	2061.8467
Beta-casein	17	40	ELEELN <u>VPGE</u> IVESLSSEESITR	4	2966.166

<sup>a</sup>Standard casein contains alpha S1, alpha S2, and beta-casein. The phosphorylation sites are underlined.



**Fig. 1** – Experimental scheme to identify phosphopeptides and map the sites of phosphorylation using two different methods.

따라서 그 이전에 분리를 위해서는 이와 성질이 다른 칼럼을 이용하여 분리하는 것이 효율을 높일 수가 있다.

Fig. 1은 본 연구에서 진행한 전체적인 연구의 흐름도를 보여 주고 있다. 질량분석기 분리 전에 분석 시료들을 더 분리하기 위해 2개의 다른 칼럼을 사용하는 두 가지 전략을 이용하였다. 특히, 트립신을 처리하는 단계가 다른 데, 즉, 양이온 교환 수지를 이용할 경우에는 칼럼에 의한 분리 전에 트립신을 처리하고, C4

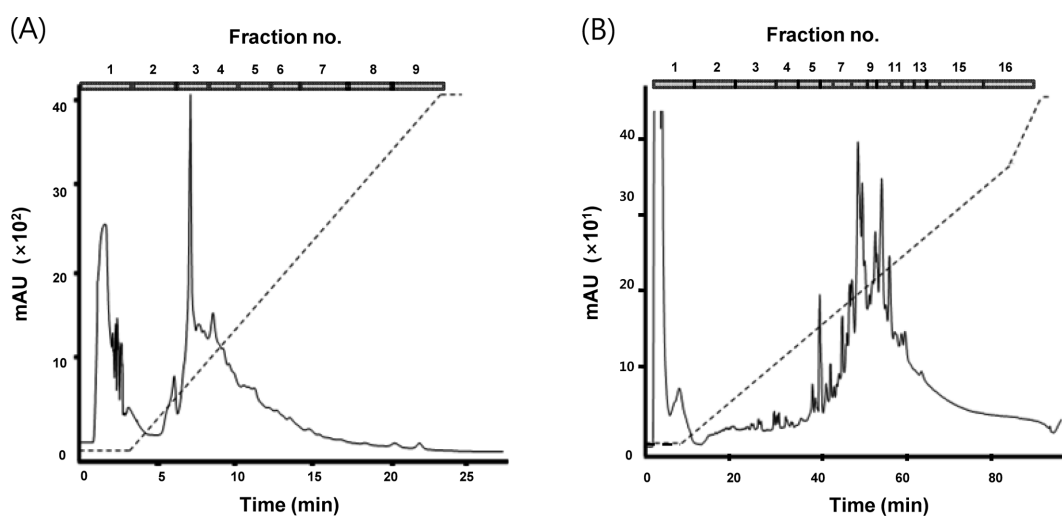
를 이용할 경우에는 분리 후에 트립신을 처리하는 것이 다르다는 것이 본 연구의 중요한 분리 전략이다.

먼저 nano-C18 칼럼과 성질이 다른 양이온 교환 수지를 이용하여 펩타이드를 분리하는 방법을 이용하였다. 이를 위해 우선 Rat 1 세포로부터 1 mg의 단백질을 얻은 후, 이를 트립신을 처리하여 펩타이드화하였다. 이들 펩타이드를 FPLC 시스템을 이용하여 양이온 교환수지 칼럼으로 분리하였고 그에 해당하는 UV 흡광도 프로파일을 얻었다. 얻어진 UV 프로파일을 기준으로 양이 적은 분획들은 많이 합치고 양이 많은 분획들은 적게 합쳐서 총 9개의 분획을 만들었다(Fig. 2A). 다른 한편, nano-C18 칼럼 이전에 C4 칼럼을 이용한 경우, C4 칼럼은 nano-C18 칼럼과 마찬가지로 역상 칼럼으로 그 성질이 거의 유사하다. 따라서, 본 연구에서는 Rat 1 세포로부터 단백질을 얻은 후, 펩타이드가 아닌 단백질(1 mg) 상태에서 먼저 C4 칼럼으로 분리한 후, 위와 같은 방법으로 하여 UV 프로파일을 기준으로 양이 적은 분획들은 많이 합치고 양이 많은 분획들은 적게 합쳐서 총 16개의 분획을 만들었다(Fig. 2B). 이 후에 이들 분획들을 트립신을 처리하여 펩타이드화 하였다.

일반적으로 역상 칼럼이 양이온 교환수지 칼럼을 이용한 것보다 분리능이 좋다고 알려져 있다. 본 실험에서는 물론 두 개의 시료 중 하나는 펩타이드이고 다른 하나는 단백질이므로 동일하게 비교할 수는 없지만, 역상 칼럼을 이용한 것이 분리 피크가 좁고 높게 나와 좀 더 효과적으로 분리가 된 것처럼 보인다.

#### TiO<sub>2</sub>를 이용한 인산화 펩타이드의 농축 및 nano-LC-MS/MS를 이용한 분석

양이온 교환수지로부터 얻어진 시료들은 이미 펩타이드 상태



**Fig. 2** – Separation of tryptic peptides by SCX and proteins by C4 columns. (A) Tryptic peptides derived from total proteins (1 mg) in Rat 1 cell was separated on SCX column (6.4 mm × 30 mm). Fractions were pooled to 9 fractions based on UV absorbance chromatography. (B) Total proteins (1 mg) in Rat 1 cell was separated on C4 column (4.6 mm × 250 mm). Fractions were pooled to 16 fractions based on UV absorbance chromatography. These fractions were dried by a centrifugal vacuum concentrator for the next experiment.

로 존재하므로 이를 예비실험에서 진행한 것처럼 TiO<sub>2</sub>를 이용하여 인산화 펩타이드 농축을 진행하였다. 하지만 C4로부터 얻은 분획들은 아직 단백질 상태이므로 이들은 트립신을 처리하여 펩타이드화 한 후, 이들을 TiO<sub>2</sub>로 이용하여 인산화 펩타이드 농축을 진행하였다. TiO<sub>2</sub>를 통하여 얻어진 인산화 펩타이드들을 각각 nano-LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 분석을 통해 얻어진 데이터들은, 방법에 적은 것처럼 Mascot 소프트웨어를 이용하여 인산화 펩타이드들과 그 인산화 위치를 밝혀내었다.

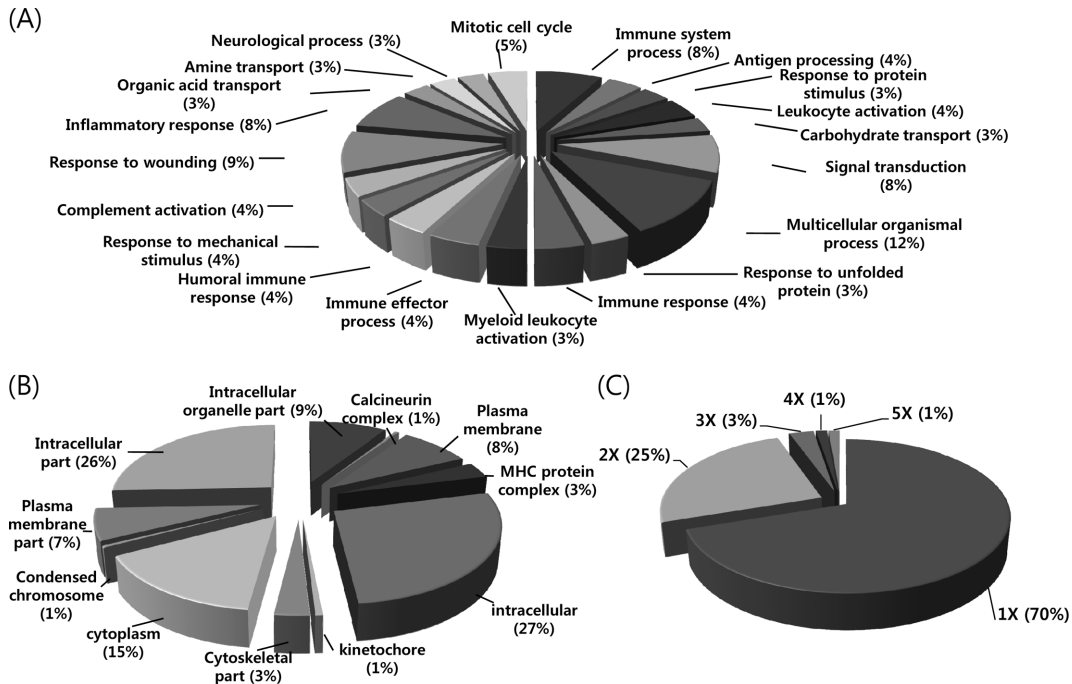
양이온 교환수지를 이용한 경우에는 41개의 단백질로부터 52

개의 인산화 위치를 찾아내었고, C4 칼럼을 이용한 경우에는 252개의 단백질로부터 375개의 인산화 위치를 찾아내었다. 이 결과를 통해 알 수 있는 것은, 양이온 교환수지의 경우, 몇 가지 단점을 가지고 있음을 알 수 있었다. 첫째, 양이온 교환수지의 분리능이 C4에 비해 떨어지고, 둘째, 양이온 교환수지의 경우 분획 내에 염(salt)을 포함하고 있어 이는 TiO<sub>2</sub>의 효율을 떨어뜨렸을 가능성이 커서, 인산화 펩타이드의 양을 감소시켜 질량 분석기에 의한 분석 효율을 감소시켰을 것으로 추정된다.

그에 비해 C4 칼럼의 경우에는 nano-LC와 동일한 성질의 칼

**Table II** – Identification of phosphopeptides and new phosphorylation sites from some membrane proteins

prot_acc	gene_name	prot_name	pep_seq
IPI00200688	Abhd6	Abhydrolase domain-containing protein 6	SpSLDDLSIVGQVKR
IPI00231615	Anxa1	AnnexinA1	pTPAQFDADELRL
IPI00231615	Anxa1	AnnexinA1	RKGpTDVNVFNTILTTR
IPI00201263	Cspg4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4 precursor	pTFNRRVLSpYLEPR
IPI00422037		Complement component 4, gene 2	GQMAMpSREPR
IPI00196620	Cubn	Cubilin precursor	IDALVQKApSFR
IPI00359875	Itgal	integrin alpha L	VAGTVELpSEK
IPI00324585	Itga1	integrin alpha-1 precursor	MoTipSKpSEVLKR
IPI00417368		KIAA1885 protein	NRQLVNWpScpTLR
IPI00363534	Lama1	laminin, alpha 1	VKVMoVDLGSGLPLTLMopTDR
IPI00191485	Pkd1	Pkd1	LLPNRPPLGGpSCR
IPI00209140	Gnas	Protein ALEX	QETALpSAAPLQRR
IPI00767314	Duox1	similar to dual oxidase 1	HWWKpTSGQLIR
IPI00210494	Sts	Steryl-sulfatase precursor	pTLRTPHIDR
IPI00210494	Sts	Steryl-sulfatase precursor	TLRpTPHIDRLALEGVK



**Fig. 3** – Analysis of phosphoproteins and phosphopeptides identified by LC-MS/MS. The identified phosphoproteins were categorized based on their molecular function (a) and subcellular localizations (b). The ratios of identified phosphopeptides were classified based on the number of phosphate group per one peptide.

럼이나, 첫 번째 분석(C4)시에는 단백질 상태로, 두 번째 분석(nano-LC) 시에는 펩타이드 상태에서 분리하였기 때문에 성질이 전혀 다른 물질들이 분리된 것과 같은 효과를 보였고, 또한 역상 칼럼의 가장 큰 특징인 효과적인 분리능을 연속해서 이용하였으므로 보다 효과적인 인산화 펩타이드를 동정해 낸 것으로 여겨진다.

본 연구에서 확인된 인산화 펩타이드들 중에서 특히 세포 신호 전달에 관여하는 인산화 위치를 규명하였고, 그 중에서도 기존의 방법으로 규명하기 어려운 막단백질로부터 동정한 인산화 펩타이드들을 표로 나타내었다(Table I).

새로운 인산화 위치는 mouse, human과 rat의 알려진 거의 모든 인산화 단백질이 함유된 PhosphoSite([www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org))를 참고한 것이고, 만약 rat의 인산화 펩타이드가 없는 단백질일 경우, rat sequence에서 상응되는 인산화 위치가 mouse 혹은 human에서 확인된다면 이 사이트는 rat에서 확인된 것으로 고려하였다.

#### 밝혀진 인산화 단백질들의 성질 분석

Rat 1 세포로부터 확인된 각각의 인산화 단백질을 세포내의 위치와 분자적 기능에 의해 분류하였다. 확인된 인산화 단백질의 분자적 기능은 Gene ontology(GO)에 의해 분석되었다(Fig. 3A). 이것은 GO annotation terms을 사용하여 분리하였다. Multicellular organismal process, response to wounding, signal transduction, inflammatory response, immune system process, mitotic cell cycle 등 세포가 살아가는 중요한 대부분의 기능에 분포되어 있음을 알 수 있다. Fig. 3B는 세포내 위치를 보여주고 있다. 대부분이 intracellular part 및 cytoplasm에 존재하였고, plasma membrane part, intracellular organelle part, cytoskeletal part, MHC protein complex 등에 존재하는 것으로 보여졌다. 또한 인산화 펩타이드내에 몇 개의 인산기가 있는지를 기준으로 분류를 해 보았다(Fig. 3C). 이 경우 펩타이드당 1개의 인산기를 포함하고 있는 것이 전체 79%에 달하였고, 이 후로 2개(25%), 3개(3%), 4개(1%), 5개(1%)의 순으로 나타났다.  $TiO_2$ 를 이용한 경우에 IMAC을 이용한 경우와 비교해서 1개 인산화기를 포함한 펩타이드들이 좀 더 많이 농축되는 현상이 있는데, 이 연구의 결과에서도 비슷한 특징을 보여주고 있다.

## 결 론

세포내에 존재하는 수많은 인산화 단백질들 및 인산화 위치를 질량분석기를 통해 전체적으로 확인하는 방법을 Rat 1 세포를 이용하여 수행하였다. 이를 위해 두 가지 분리 전략(C4 및 양이온 교환 수지)을 이용한 결과, 단백질 상태에서 C4를 이용해서 분리 후 이를 펩타이드화 한 후,  $TiO_2$ 를 이용하여 농축하는 방법이 더 효과적이었다. 규명된 인산화 펩타이드를 기반으로 인

산화 단백질의 기능 및 위치 등을 확인한 결과 분석이 어려운 막 단백질들에서 새로운 인산화 위치를 갖는 단백질들까지도 찾을 수 있음을 보여주었다. 따라서 본 연구에서 한 가지 세포를 이용하여 전체적인 인산화 단백질을 연구하는 방법에 대한 것을 제시하였으며 이는 여러 가지 신호를 세포에 처리한 후 변화되는 인산화 단백질들의 양적인 변화들을 확인하는 데 유용하게 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(NRF-2010-0022811) 으로부터 지원받아 수행된 연구임.

## References

- Hunter, T. : The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **353**, 583 (1998).
- Hunter, T. : Signaling 2000 and beyond. *Cell* **100**, 113 (2000).
- Pawson, T. and Nash, P. : Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**, 445 (2003).
- Mumby, M. and Brekken, D. : Phosphoproteomics: new insights into cellular signaling. *Genome Biol.* **6**, 230 (2005).
- Machida, K., Mayer, B. J. and Nollau, P. : Profiling the Global Tyrosine phosphorylation state. *Mol. Cell Proteomics* **2**, 215 (2003).
- Mclachlin, D. T. and Chait, B. T. : Improved  $\beta$ -elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides. *Anal. Chem.* **75**, 6826 (2003).
- Lee, J., Xu, Y., Chen, Y., Sprung, R., Kim, S. C., Xie, S. and Zhao, Y. : Mitochondrial phosphoproteome revealed by an improved IMAC method and MS/MS/MS. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 669 (2007).
- Nühse, T. S., Stensballe, A., Jensen, O. N. and Peck, S. C. : Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 1234 (2003).
- Zhou, W., Merrick, B. A., Khaledi, M. G. and Tomer, K. B. : Detection and sequencing of phosphopeptides affinity bound to immobilized metal ion beads by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **11**, 273 (2000).
- Zhang, X., Ye, J., Jensen, O. N. and Roepstorff, P. : Highly efficient phosphopeptide enrichment by calcium phosphate precipitation combined with subsequent serial immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) enrichment. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 2032 (2007).
- Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P.

- and Jørgensen, T. J. : Highly selective Enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 873 (2005).
- 12) Thingholm, T. E., Jørgensen, T. J., Jensen, O. N. and Larsen, M. R. : Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat. Protoc.* **1**, 1929 (2006).
- 13) Pinkse, M. W., Uitto, P. M., Hilhorst, M. J., Ooms, B. and Heck, A. J. : Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal. Chem.* **76**, 3935 (2004).
- 14) Aebersold, R. and Mann, M. : Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198 (2003).
- 15) Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. and Mann, M. : Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635 (2006).
- 16) Villen, J., Beausoleil, S. A., Gerber, S. A. and Gygi, S. P. : Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1488 (2006).
- 17) Imanishi, S. Y., Kochin, V., Ferraris, S. E., de Thonel, A., Pallari, H. M., Corthals, G. L. and Eriksson, J. E. : Reference-facilitated phosphoproteomics: fast and reliable phosphopeptide validation by  $\mu$ LC-ESI-Q-TOF MS/MS. *Mol. Cell Proteomics* **6**, 1380 (2007).