

Proteomics의 현황과 전망

한국생명공학연구원

김 승 호

I. 서 론

이제는 이른바 '포스트 게놈시대'가 열린 것이다. 최근, 미국 Celera사와 NIH를 중심으로 인간 게놈 염기의 인간염색체 염기서열 초안을 공개하였고, 이 외에도 31종의 생물체의 게놈구조도 밝혀져 있을 정도다. 이와같은 유전자의 기능을 규명하는 총체적인 연구 분야를 'Functional genomics'라 정의하며, 이는 유전자를 실험재료로 사용하는 genomics, 세포내의 총체적인 단백질군을 대상으로 연구하여 유전자 기능을 규명하는 proteomics, 그리고 이 두 분야를 공통적으로 지원하는 bioinformatics로 구분되어 질 수 있다. 최근까지만 하더라도 유전자나 세포의 기능 연구에 대한 분자생물학적인 접근은 대부분 단일 유전자나 그 유전자가 발현하는 mRNA의 발현조절을 중심으로 이루어졌으나, 요즘에는 유전체나 단백질체를 중심으로 한 이른바 총체적 생물학적 개념에서의 연구로 바뀌고 있는 추세이다.

DNA 정보가 생명체에서 일어나는 모든 활동을 근본적으로 지배하고 있다고 하지만 질병의 발현은 한 단계 나아가 단백질과 저분자 수준에서 일어난다. 다시 말해서 유전자 레벨보다는 단백질 수준에서 원인을 규명해야 한다는 것이다. 이러한 이유로 인간게놈 프로젝트가 거의 끝난 지금 Post Human Genome Project로 단백질의 상호작용이나 그들의 기능을 규명하는 Functional Genomics 시대가 미국에서부터 새롭게 시작되고 있으며, 미국에는 지금 프로테오믹스와 protein chip의 연구 개발이 활발하게 진행되고 있으며 이것을 토대로 한 벤처기업들도 나타나고 있다.

II. 프로테오믹스의 개념

1. 프로테오믹스의 개념

프로테오姆 (proteome) 이란 말은 어원적으로 단백질체 (protein-body (-some))라고 풀이 할 수 있으나, 실제로는 게놈 (Genome)의 상대어로서 <PROTEin expressed by a genOME>의 합성어로 인식되고 있는 말이다. 이 말은 1995년에 이태리 Siena에서 열린 2-D Electrophoresis meeting에서 처음으로 Marc Wilkins에 의해서 사용이 보편화되었다.

프로테오姆 (Proteome)이란 유전체로부터 만들어 질 수 있는 모든 단백질의 총체로서 단세포 생물인 경우 각각의 세포가 같은 양상을 가지나, 다세포 생물인 경우 각각의 세포가 같은 유전체를 갖지만 프로테오姆의 양상은 다를 것이며, 같은 세포라도 주위 환경이 달라지면 다른 양상을 보이므로, 프로테오姆을 유래하는 유전체는 일정하지만 특정 세포나 특정 조건하에서 프로테오姆의 양상은 항상 변하는 동적인 개념이다. 따라서 프로테오믹스란 유전자(체)의 산물인 단백질들을 총체적으

로 확인하고 이들 단백질들간의 상호작용 등을 포괄적으로 규명하는 연구를 일컬으며, 정적인 유전자 서열에 동적인 생체 기능을 부여하는 것이 바로 프로테오믹스이다.

2. 프로테오믹스의 연구 방법

1) 이차전기영동 (2-DE) 분리 기술

프로테오믹스는 단순히 세포의 DNA 발현에 대한 연구보다는 genome의 역학적 단백질 산물과 그들의 기능에 따른 상호관계에 대한 연구가 목적이다. 결국 기능 탐색 및 검증의 단계를 얼마나 효과적으로 수행할 수 있는가가 성패의 관건이 된다. 이러한 프로테오믹스에서 응용될 수 있는 가장 효과적인 분석 기술의 하나가 이차원 전기영동 (2-DE)을 이용한 기술이다. 이러한 이차원 전기영동 기술은 프로테오믹스 기술에 곧바로 응용될 수 있는 중추적인 기술로 현재 생명공학 기술 분야에서 매우 핵심이 되는 기술이다.

시료의 전처리 기법의 발달과 함께 2-DE에 대한 대체 방법도 개발되고 있는데, biotin이나 방사능 동위원소를 단백질의 N-terminal에 표시시켜 특정 단백질군의 정량적인 차이를 규명해 내는 방법이 시도되고 있다. 이와 같은 방법으로 일종의 micro-chip을 affinity ligand로 사용하여 대량으로 빠르게 단백질을 분리하거나 microscale solution isoelectrofocusing (sol-IEF)을 이용, 세포나 임상시료를 전처리 하여 2-DE 분석을 하게 하는 방법 등도 개발 중에 있다. 그러나 아직은 2DE를 대체할 만한 확실한 방법이 상용화되지 않은 것은 사실이다.

2) MS 분석 기술의 최신동향

MALDI-MS는 보편적으로 펩티드 분석에 활용되고 있는데, 이 장비에 일종의 microsystem을 붙여서 희소 농도의 peptide를 분석하는 방법도 개발중이다. FTICR MS는 100 kDa 이상의 단백질을 분석하는데 활용되고 있는데, 특히 ESI-FTICR의 경우 affinity proteomics라는 새로운 시도를 가능하게 하고 있다. MALDI QIT (quadrupole ion trap) reflection TOF MS는 당쇄화된 당단백질들의 구조적 특성을 분석하는데 활용되고 있다. 이 기기는 기존의 MALDI가 지니는 장점들과 매우 높은 해상도, 분해능을 갖고 있으며 질소 laser를 사용하는 것이 특징이다.

3) 프로테오믹스의 자동화

프로테오믹스의 자동화 과정은 인간계능에 적용되었던 자동 염기서열분석기나 PCR와는 다르게 대부분의 단백질은 DNA와는 달리 branch나 변형구조를 지니고 있기 때문에 초고속 구조 분석이나 분리가 어렵기 때문에 프로테오믹스의 자동화 과정은 쉽지가 않다. 여기서 자동화라 함은 2-DE나 그 대체분석 방법으로부터 MALDI 분석을 거쳐 최종적으로 단백질을 annotation하는 일련의 과정을 의미한다. 부분적으로 이루어지고 있는 자동화 과정을 간략하게 소개하면 2-DE를 한 후 gel 자체를 통째로 trypsin 처리하고, 이를 다시 PVDF membrane에 blotting 시켜서 각 spot 별로 MALDI 분석을 대량으로 하여 데이터를 분류하고 각각의 단백질을 annotation하는 것이다. 그러나 여기에는 아직도 해결해야 할 문제점들이 많다. 예를 들면, trypsin 처리 과정의 재현성, blotting의 효율성, 각 spot 별 MALDI 결과의 체계적인 management 등이다.

4) Imaging 분석, Data display 및 Data Base

2-DE를 통해 얻은 이미지들을 상호비교 할 때 사용되는 프로그램에는 기존의 Melanie III (Gen-Bio), Imgage Master (Amersham Pharmacia) PDQuest (BioRad) 등이 가장 보편적으로 사용된다. DB 구축은 proteome informatics의 가장 중요한 부분으로, 프로테오믹스 실험을 통해 산출되는 많은

데이터의 효율적인 보관과 분석에 필수불가결하다 (www.proteomix.org). 현재 대다수의 2D-DB에서는 Make2ddb라는 프로그램을 사용하여 각 gel image를 관리하는 것이 보편적이다. 최근에 Bio-Rad와 MicroMass 공동으로 WorksBase System™을 개발하여 샘플제조로부터, 각 샘플의 임상적 history, 데이터 저장 및 분석 등이 가능하게 되었다. 시장에 출시되어 일부 사용중이나 고가인 점이 부담이 되고 있다.

3. 프로테오믹스의 문제점

프로테오믹스는 다양한 적용성과 HTS 방식의 하나임에도 불구하고 기술적인 한계성을 지니고 있다. 예를 들면, 샘플원의 분석에 따른 재현성과 각종 샘플원에 대한 표준화된 샘플 전처리조건의 미확립, 낮은 농도로 존재하는 단백질과 높은 농도로 존재하는 단백질들간의 분별, 그리고, glycosylated, methylated와 같이 수식화된 단백질에 대한 분석법의 불안정성 등이다. 또한 genomics 연구 분야와는 달리 자동화 기술이 아직 완전하지 않은 점이다.

III. 프로테오믹스의 산업화 동향

1. 국내의 현황

국내에도 프로테오믹스에 대한 관심이 매우 높아 일부 프론티어 사업과제를 통하여 시범적으로 진행중에 있다. 2D gel 분석부터 MALDI-TOF 및 Image 분석 시설이 최근 어느 정도 갖추어지고 있다. 이미 미국과 일본은 정부와 기업체가 합동으로 '프로테오믹스센터'를 설립하거나 설립중에 있으며 4년전에 시작한 호주의 APAF 등에 비하면 우리나라도 그리 늦은 편은 아니다. 한국생명공학연구원에서도 proteome 연구실을 중심으로 프로테오믹스 연구에 매진하고 있다. 이러한 선도그룹들을 중심으로 서로의 정보를 교환하고 기술을 증진시킨다면 본격적인 프로테오믹스를 확산시켜 이를 적극 활용할 경우 핵심 기술은 물론 여러 가지 기초생물, 생화학, 의학, 약학 분야에서 그 적용도는 매우 클 것이다. 앞으로 정부나 민간 모두 집중 투자해야할 대상이라고 믿고 있으며, 과거부의 '21C 프론티어 사업'에서 다시 새롭게 독자적으로 보다 비중있게 기반 기술의 과제지원이 이루어 져야 할 것이다.

2. 국내 프로테오믹스의 발전방향

프로테오믹스는 광범위한 의미로 단백질화학의 범주에 속한다. 그러나, 분리, 정제, 클로닝 등을 통하여 개개의 단백질을 하나씩 연구하는 종래의 방법과는 달리 프로테오믹스에서는 모든 단백질, 즉 프로테오음을 분리, 전개하여 일종의 단백질 지도 (protein map)를 만들고, 그 지도상에 배열된 단백질을 동시에 분석한다. 이러한 프로테오믹스의 산업화는 단백질 지도를 만들 수 있는 방법인 2차원 전기영동이 1975년 소개됨으로써 이론적으로 가능하였으나 여러 가지 기술적 난관으로 실질적 활용은 불가능하였었다.

1990년대 들어서서 단백질의 분리 및 분석기술의 급속한 발달, 정보처리 능력의 향상, 그리고 World Wide Web을 통한 신속한 정보의 교환으로 프로테오믹스연구가 현실화되었고, 질량 분석기를 이용한 단백질 분석 기술의 발달로 초고속-다량 (high-throughput)분석을 가능하게 함으로써 프로테오믹스 활용의 질과 폭을 한 단계 높여 놓았다. 현재 성장기에 접어들고 있는 프로테오믹스는

지속적인 기술의 개발과 더불어 생물산업에서의 활용이 점차 확대되고 있다.

3. 프로테오믹스 관련 기업 현황

세계적 생물산업회사들은 프로테오믹스의 중요성과 산업화를 위한 무한한 잠재력을 인식하고 자체 내 제반 기술을 확보하거나 프로테오믹스 전문 벤처 회사들과 전략적 제휴를 맺고 있다. 특히, Millennium사나 Incyte사와 같은 genomics를 표방하던 회사들은 자체 내 프로테오믹스를 위한 인프라를 구축하거나 프로테오믹스 전문회사와 전략적 제휴를 맺어 프로테오믹스와 genomics를 접목시킴으로써 점차 치열해지고 있는 신약개발분야에 경쟁력을 확보해 나가고 있다. 또한 국내에서도 소수의 프로테오믹스 전문 바이오벤처 회사가 설립되어 프로테오믹스 기술개발과 상품 개발에 뛰어들고 있으나 현재로서는 그 활약이 미미한 실정이다.

IV. 프로테오믹스 기술의 개발 및 응용

1. 프로테오믹스 기술의 개발 및 응용

프로테오믹스 연구는 단순한 연구 기술만으로는 연구진행이 어려우며 10년 이상의 연구경험과 Design에서 구조, 기능분석에 이르기까지 모든 분야가 요구되는 단백질 연구의 총화가 요구되는 분야이다. 한편, 프로테오믹스 기술 중에서 functional grouping과 library 탐색 기술은 의학적 측면에서 암 전이 단계에서 특히 중요한 protease를 검색함으로써 세포나 기관에서의 암전이 진단 및 그 전이 기전의 연구, 동맥경화, 뇌졸중, 혈전증 등의 심혈관계 관련증상의 대체 치료제 탐색 및 검증, 노화와 치매에 관련된 caspase의 탐색 및 치료제 개발, AIDS에서 특히 중요한 HIV-1 protease의 탐색 및 치료제 개발 등 여러 분야에 이용될 수 있는 기술이다. 이러한 프로테오믹스 기술은 또한 유전자 수준과 단백질 수준에서 병원 기전의 연구 및 치료제 탐색을 위하여 응용될 수도 있다. 이와 같이 프로테오믹스 기술은 재조합 단백질 제조기술, 물질의 분리 및 정제기술, 물질의 분석기술과 같이 광범위한 분야에서 핵심적으로 응용 되어질 수 있는 기술이다.

2. Enzymomics: 프로테오믹스 연구 기술의 새로운 개념

Zymography 기술은 효소를 전기영동 gel 상에서 특정 단백질을 직접적이며 선택적으로 확인할 수 있는 기술로 간단하고 효과적으로 효소를 검증하는데 많이 이용되고 있다. 이 기술은 1939년 Gomori에 의해 처음 시도되었으며 1957년 Hunter와 Markert에 의해 최초로 zymogram이라 명명되었다. 한편 1978년 Granelli-Piperno와 Reich는 SDS-PAGE를 이용하여 분리된 효소를 기질이 포함된 agarose gel film을 이용하여 확인하는 방법을 최초로 시도하고 이 방법을 reverse zymography라 명명하였다. 그 이후 20여 년 동안 약 100여종의 효소가 이 기술을 통하여 확인 검증되었으며, 지금도 전 세계적으로 많이 이용되고 있고 끊임없이 응용 및 발전되고 있는 기술이다. 본 연구실에서 개발한 fibrin zymography 기술은 특이적 기질을 SDS 전기영동에 직접 도입한 것으로 활성을 지닌 효소를 일차원 뿐만 아니라 이차원 전기영동의 gel 상에서 직접 확인할 수 있으며, 특히 혼합 상태의 시료에서 활성이 있는 단백질만을 효과적이며 시각적으로 빠르게 탐색 및 검증할 수 있어 의약, 식품, 농업, 임업 뿐만 아니라 실험실에서의 다목적 기초과학 연구에도 크게 이바지할 것이다.

본 연구실에서는 프로테오믹스의 연구 및 응용에 일환으로 프로테오믹스 연구기술의 새로운 개념인 **enzymomics**를 제안하였으며 장차 **enzymomics** 연구 기술의 응용으로 개체간의 **enzyme map**의 제조와 이것을 활용한 유용 생리활성 물질의 분리 및 노화와 난치성 질환 연구에 활용할 계획이다. **Enzymomics**는 **Enzyme Zymography**와 **proteomics**의 합성어로서 프로테오믹스 연구기술의 일환으로 **2D-zymography**와 프로테오믹스의 기술을 결합한 것이다.

현재 프로테오믹스 연구의 핵심은 탐색과 검증의 대량성과 신속성에 있어서 얼마나 효과적인 기술을 사용할 수 있는가에 있다. 현재 탐색과 검증의 방법으로 제안되고 있는 것 들로는 **mass spectrophotometry**, **zymography**, **Biochip** 등이 있는데 **functional protein group**의 탐색에 있어서 프로테오믹스 기술은 특정 효소의 탐색 및 검증의 목적으로 여러 분야에서 응용되고 있으며, 효소를 이용한 식품 개발, 치료제 및 진단시약 개발 등 의약, 식품, 농업 및 임업 분야에 광범위하게 이용되고 있는 기술이다. 특히 최근 쟁점화되고 있는 암 진단 및 암 전이 기전의 연구, AIDS의 전이 기전 연구, 동맥경화 및 뇌졸중 치료제 개발 등을 수행하기 위해서는 병의 원인과 관련된 다양한 효소 및 단백질 등을 선택적이며 간편하게 탐색 및 검증해야 하는 문제점이 제기 되고 있으며 소량으로도 고도로 민감하게 이러한 효소 및 단백질 등을 확인하는 측면이 중요한데 이를 위해서는 개량된 프로테오믹스 기술이 필요하다. 단백질은 DNA와 다르게 상태에 따라 발현의 종류와 양이 다르고 때에 따라서는 **modification**의 정도 또한 다양하므로 검출과 변형의 기술이 없이는 연구의 한계가 뚜렷할 수밖에 없다. 인산화와 당화, 그리고 황화 변형 기술이 이러한 단백질 변형의 핵심 기술로서 **functional grouping**의 방법으로 제시되고 있다.

V. 미래의 프로테오믹스의 전망

프로테오믹스라 함은 결국은 단백질의 기능을 연구하는 분야로 기존의 단백질 연구와 목적상으로 볼 때 크게 다르지 않다. 다만 세포 또는 조직 등을 구성하는 단백질의 전체 (프로테오믹스)를 대상으로 해서 대량으로 그리고 단백질의 상대적인 양을 훼손하지 않고 분석을 한다는 점에서, 기존의 몇몇 개별적인 단백질을 대상으로 수행하던 방식과 차이를 가진다고 할 수 있다. 예측되지 않았던 새로운 정보들로부터 다른 해석을 가능하게 하고 통합된 정보들로부터 새로운 가설들을 빠르게 세워나감으로써 연구 분야에 대한 지식의 폭과 정보 생산 속도를 가속화할 수 있다는 것이다.

프로테오믹스는 단백질의 분리와 단백질의 동정에 관한 기술이 그 기술적 핵심을 이루고 있다. 이차원 전기영동법에 의한 단백질 분리와 **MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight) MS** 등에 의한 단백질 동정 및 특성 연구는 현재의 프로테오믹스를 가능하게 한 중요한 기술들이며 이들 방법에 대한 보완 또는 대안으로서 **LC MS/MS**, **SELDITM technology** 등이 기술적 발전을 거듭하고 있다. 각 기술들이 가지는 장점에도 불구하고 이들 각개의 기술들 만으로서는 단백질 연구에서 기대하는 충분한 기술적 조건들을 만족시켜주지는 못하고 있으며, 여전히 미량 존재 (**low abundant protein**) 단백질들에 대한 분석이 용이하지 못한 기술적 한계점들을 지니고 있다. 또한 현재까지 단백질의 분리능력에 있어서는 가장 탁월한 결과를 보여주는 이차원 전기영동법을 이용한 프로테오믹스 기술은 복잡하고 긴 분석 과정 때문에 완전 자동화가 어려운 상황이며 **through-put study**를 위해서는 기업형의 설비가 갖추어 져야만 한다. 프로테오믹스 기술이

안고 있는 이러한 한계에도 불구하고, 이 기술을 도입해서 얻을 수 있는 정보의 양은 현재까지로는 지난 십 수년간 이어온 연구의 결과들의 많은 양들을 짧은 시간 내에 얻을 수 있음을 보아 왔고, 이러한 정보의 획득 능력은 단백질 연구의 새로운 돌파구가 찾아지지 않은 한 당분간은 지속될 것이라고 전망되고 있다.

VI. 결 론

정보화시대에서의 생물 및 의학 관련 연구는 매우 빠른 속도로 발전하고 있으며, 그 방식 또한 체계적이고 유기적으로 진행되고 있다. 이러한 경향에서 경쟁력을 가지기 위해서는 생물학 연구 관련 새로운 기술들을 빠르게 도입하고 이를 발전시켜야만 하며 산학연간의 원활한 정보교류가 무엇보다 절실히 요구된다고 할 수 있다.

현대의 생물산업은 신속한 상품 개발을 요구하고 있는데, 프로테오믹스는 이러한 추세에 부합되는 새로운 도구로서 **genomics**와 상호 보완적으로 21세기 생물산업의 새로운 도약의 발판을 마련하여 복잡한 생명현상을 규명하려는 인간의 노력에 교량 역할을 수행할 것이다. 우리의 생물산업 발전을 위하여 프로테오믹스의 활용은 필수적이며, 이를 위해서는 제반시설의 확립과 더불어 전문가의 양성이 선결되어야 할 것이다.

또한, 21세기에 들어서서 프로테오믹스 뿐만이 아니라 새로운 개념인 **Glycomics**와 **lipidomics**가 순차적으로 부각되고 있으며 인간 체내의 총체적인 구성성분인 지방, 당, 그리고 단백질 발현 및 그 기능에 대한 총체적인 **map**이 밝혀질 날도 얼마 남지 않았다고 하겠다. 본 실험실에서는 이러한 프로테오믹스의 연구 및 응용에 일환으로 프로테오믹스 연구기술의 새로운 개념인 **enzymomics**를 제안하였으며 장차 **enzymomics** 연구 기술의 응용으로 개체간의 **enzyme map**의 제조와 이것을 활용한 유용 생리활성 물질의 분리 및 노화와 난치성 질환 연구에 활용할 계획이며 이것을 **glycomics**와 **lipidomics**에도 적용한다면 총체적인 인체 기능의 신비를 벗기는데도 일조를 할 수 있을 것이다.