

## 생식생물학에서 프로테오믹스의 응용

김 호 승 · 윤 용 달<sup>†</sup>

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

### Potential Importance of Proteomics in Research of Reproductive Biology

Ho-Seung Kim and Yong-Dal Yoon<sup>†</sup>

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**ABSTRACT** : The potential importance of proteomic approaches has been clearly demonstrated in other fields of human medical research, including liver and heart disease and certain forms of cancer. However, reproductive researches have been applied to proteomics poorly. Proteomics can be defined as the systematic analysis of proteins for their identity, quantity, and function. It could increase the predictability of early drug development and identify non-invasive biomarkers of toxicity or efficacy. Proteome analysis is most commonly accomplished by the combination of two-dimensional gel electrophoresis(2DE) and MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) MS(mass spectrometry) or protein chip array and SELDI-TOF(surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight) MS. In addition, understanding the possessing knowledge of the developing biomarkers used to assess reproductive biology will also be essential components relevant to the topic of reproduction. The continued integration of proteomic and genomic data will have a fundamental impact on our understanding of the normal functioning of cells and organisms and will give insights into complex cellular processes and disease and provides new opportunities for the development of diagnostics and therapeutics. The challenge to researchers in the field of reproduction is to harness this new technology as well as others that are available to a greater extent than at present as they have considerable potential to greatly improve our understanding of the molecular aspects of reproduction both in health and disease.

**Key words** : Proteomic approaches, Reproduction, Biomarkers.

**요 약** : 프로테오믹스(proteomics, 단백질체학이라고도 함)의 잠재적 중요성은 간질환, 심장질환, 몇몇 종류의 암 등의 의학, 생식 독성, 발생 독성, 생체 독성 연구 분야에서도 명백하게 제시되었다. 그러나 단백질을 대상으로 연구하여 유전자 기능을 연구하는 프로테오믹스 연구를 각각의 분야에 접목시키려는 노력은 아직까지 빈약하다. 프로테오믹스는 기능을 갖는 단백질들의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정하는 가장 직접적인 수단이고, 질병, 약물투여, 쇼크, 내분비계 장애물질 등 생물학적인 동요(perturbation)에 의하여 변하는 단백질들의 발현 양상 변화를 정확하게 관찰할 수 있게 한다. 그리고 생체내 유전자 발현의 궁극적인 양상을 규명할 수 있으며, 또한 유전자, 단백질 및 질병간의 연결고리를 제공한다. 기존의 biomarker는 다른 질병 표지자와 연관성이 높아 직접적인 biomarker와 정확한 연관을 판정하기 어렵다. 따라서 대량 발굴 탐색(high-throughput screening)이 가능한 2차원 전기 영동 분석과 MALDI-TOF 또는 protein chip array와 SELDI-TOF에 의한 단백질 분자 구조 분석 기술 및 이들을 지원하는 생물정보학(bioinformatics)의 발전을 이용하여, 생식학 연구에 이용할 수 있는 표적 단백질 발굴 및 정성 정량적 연구에 적절한 이용이 가능할 것이다. 이러한 연구는 생식과정 중 배아 발생 및 조직 기관 발생 중 유전자 발현의 변화, 내분비계 장애물질 등 호르몬 및 독성 물질의 작용 기전, ecotoxicogenomics 지표 marker의 변동 분석, 중간대사물질체학(metabolomics)에의 이용 등등의 연구에 필수적인 방법으로 발전할 것이다.

## 서 론

세포내 정자 주입 및 특수 유전자의 주입, 동물 유전자 형

질변환 조작 기술과 동물 복제, 인체 배아 줄기세포 분화 등의 생식보조술 및 발생공학적 연구는 최근 상당한 속도로 눈부시게 발전하고 있다. 그리고 각각의 spots로 구성된 수십만의 다른 서열을 포함하는 DNA 또는 oligonucleotide가 한 개의 칩(chip) 상위에 놓여진 microarray가 유전자 발현을 조사하는데 적용되고 있다(Grave, 1999). 더 나아가, 인간 게놈 프로젝트(Human Genome Project)에 의해 생물학에서 가장 중요한 인간 게놈에 대한 전체 지도가 완성되어, 연구자들에게 자연과학에 더욱 접근할 수 있는 획기적인 발판이 마련되었

\* 본 연구는 한국과학재단 선도기초과학연구실 연구비(R14-2003-036-01002-0) 지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup>교신저자: 서울시 성동구 행당동 산 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2290-0955, (팩) 02-2294-0955, E-mail: ydyoon@hanyang.ac.kr

다. 그러나 이 거대한 데이터베이스가 세포나 전체 조직이 생물학적 변화와 연관되어 있는지 또는 어떻게 건강과 질병이 일어나는 동안 분자적 수준에서 실제로 작용하는가에 대한 이해를 돕는 연구는 단지 시작에 불과하다. 지금까지, 고도의 생산성을 갖고 있는 DNA를 분석할 수 있게 하는 분자 생물학적 기술은 전달의 산물(단백질)보다는 말 그대로 전달(mRNA 또는 cDNA)을 강조하였다(Blackstock & Weir, 1999). 이런 시도가 아직까지는 중요하게 남아있는 반면, DNA 서열 데이터 자체는 단지 선택적 분리에 의해 각각의 유전자로부터 생성된 단백질의 이성질체 또는 번역 후 변형되는 단백질 등의 단백질 발현 수준에 관해서 아무 것도 알려주는 것이 없다. 따라서 최근 생명과학을 대변하는 유전자, 전사물, 단백질의 분석 수준은 상당히 발전되었으나 이들을 분자생물학적 수준에서 생식생물학에 이용하는 데는 아직 상당히 미흡한 단계이다. 본 연구는 프로테오믹스를 정의하고, 최근까지의 발전상을 요약하며, 생식생물학에 관한 분자 수준의 이해를 도모하고 이를 이용할 수 있는 가능성을 제시하고자 한다.

## 프로테오믹스

지금까지 알려진 생식생물학에 관한 연구는 특정 물질의 인체내 작용 기전 분석과 immunohistochemistry 등을 이용한 biomarker를 탐색한 것들이 있지만, 분자 수준의 연구에서 프로테오믹스를 응용한 연구는 절대적으로 부족하며, 생물공학이나 의학 등에 비해 거의 비교할 수 없을 만큼 빈약하다. 생식생물학에 프로테오믹스를 접목하려는 시도는 태동기라 할 수 있으며, target protein 또는 probe를 찾는 일이 가장 핵심적 역할일 것이다. 현재 인간의 게놈 구조가 완전히 밝혀짐에 따라 인간 유전자의 기능을 본격적으로 연구할 수 있는 이른바 포스트게놈 시대가 시작되었다. 그러나 생물의 전체 유전자의 구성을 분석하여, 개개의 유전자 기능을 연구하고, 또 유전자의 기능을 밝히는 총체적인 연구 분야를 유전체 기능분석학(functional genomics)으로 정의한다. 여기에는 기술적으로 DNA나 RNA를 시료로 사용하여 수행하는 지노믹스(genomics, 유전체학이라고도 함), 유전자의 발현을 연구하는 트랜스크립토믹스(transcriptomics), 단백질을 대상으로 연구하여 유전자 기능을 연구하는 프로테오믹스, 그리고 중간대사물질체학은 분석생화학에서 대두되는 분야로 -omics의 마지막 단계라 할 수 있다. 즉 생명체의 생리적 기능, 유전적 변이, 질병 및 환경의 변화에 따른 적응 등을 연구함으로써 중간대사물질체학의 변화는 phenotype의 변화를 예견 가능하게 한다(Fiehn, 2002; Weckwerth, 2003; Dettemer & Hammock,

2004). 더 나아가, 이들 분야를 지원하는 생물정보학(bioinformatics)으로 구분된다. 프로테오믹스(proteome)이란 게놈의 상대 어로서(PROTEin expressed by a genOME) 합성어이며, 프로테오믹스는 프로테오믹스의 어미에 -ics가 붙어 프로테오믹스를 연구하는 방법과 기술을 포괄적으로 의미하는 말이다. 다시 말하면, 단백질의 성질을 발현, 번역 후 변형(post-translational modification), 다른 단백질과의 결합에 초점을 두고 연구하여, 세포내 변형 과정과 네트워크 형성을 질병의 진행 과정과 연계시켜 총괄적으로 이해할 수 있는 연구 분야를 뜻한다(James, 1997).

### 1. 지노믹스와 프로테오믹스

예를 들어, 지노믹스는 생물의 유전자 구성을 알기 위하여 전체 genome의 염기 서열을 결정하고, 개개 유전자의 기능을 알아내고, 최근의 유전체 기능분석학을 발전시켜 왔다. 유전체 기능분석학의 핵심은 DNA 수준에서 주로 유전자의 발현 양상을 분석하는 것으로 그 대표적인 예로는 DNA microarray technology가 있다. 그러나 지노믹스의 핵심적 연구 대상인 인간 유전체 염기 서열이 밝혀졌음에도 불구하고 염기 서열만으로 이 유전자 산물의 기능을 완전히 이해할 수 없다. 그러므로 유전자가 전사되어 단백질까지 생성되었다 하더라도 최종적으로 세포내에서의 기능 여부는 얼마나 적절하게, 그리고 정교하게 단백질 합성 후 변형되는가에 달려 있으므로 최종적으로 완벽한 구조가 갖추어진 단백질을 분석하지 않고는 대상 유전자의 세포내 기능을 알아낼 방법이 없다. 특히, 유전자 하나의 mRNA가 만드는 단백질의 실제 기능적인 모습은 세포, 조직, 시간, 조절인자에 따라 여러 모습으로 변하기 때문에, 이것을 생리적 변화에 따라 분석하는 도구와 체계가 당연히 필요하다. 이것을 해결할 수 있는 곳이 바로 프로테오믹스 영역이다. 지노믹스는 분석의 효능적 측면에서 핵산 간의 결합반응 과정에서 나타나는 위양성반응의 문제점 등으로 인해, 그 결과로 얻어진 발현 정보를 유전자 개별로 확정할 수 없는 난점을 갖고 있다. 그러므로 결과의 해석에 유의하여야 할 뿐 아니라, 얻어진 정보의 확정을 위해 다시 염기 서열을 분석하여야 한다. 이로써 경제적 부담이 가중되거나 새로운 유전자 및 유전자간의 상호관계를 분석하는 데는 여전히 강력한 수단이 된다. 한편 프로테오믹스의 경우 지노믹스와 마찬가지로 분석의 효능성, 경제성 측면에서 제한사항이 존재할 뿐만 아니라 미량으로 발현되는 단백질의 경우 분석 등이 곤란한 점과 현재로서는 미진한 수준인 단백질 데이터베이스 구축으로 인해 생물정보학의 도움을 많이 받지 못하고 있다. 그러나 기능 발현에 필요한 단백질

의 최종적 상태를 분석 대상으로 한다는 점에서, 나름대로 커다란 장점을 갖고 있다. 이 기술의 발전은 대량발굴탐색 등(high-throughput screening)이 가능한 2-dimensional gel electrophoresis(2DE)와 MALDI-TOF 또는 protein chip array와 SELDI-TOF에 의한 단백질 분자 구조 분석기술 및 이들을 지원하는 생물정보학의 발전과 연결되어 있다. 따라서 프로테오믹스는 어떻게 단백질의 표현형이 질병과 약물 처리에 따라 변화하는지 분석할 뿐만 아니라, 세포의 생리적 상태 변화에 따른 분자적인 현상과 세부적인 기전을 발굴할 수 있고, 이로 인한 약물 표적의 식별과 검증을 할 수 있게 된다. 실제로, 프로테오믹스가 약물 표적 발굴에서도 가장 강력한 기술인 이유는 단백질만이 실제로 약물의 mode-of action의 최종 장소이며, 유전자 발현에서 보이는 효과들은 단순히 단백질 수준에서 내는 약물 효과에 대한 반응에 지나지 않고, 유전자 발현과 단백질 발현간에는 직접적인 관련성이 항상 있는 것은 아니기 때문에 유전자와 이것의 기능간의 교량 역할을 할 수 있는 단백질의 역할을 분석하는 것이 중요하다. 왜냐하면, 단백질-단백질간의 결합이 세포내 생물학적 작용의 최종적인 행위가 되기 때문이다.

## 2. 단백질 분석기술

프로테오믹스의 시발점인 단백질 생화학은 일시적으로 많은 시간이 소비되는 어려운 일로 인지되어 왔고, 2DE가 매우 정교한 단백질 분리기술인데도 불구하고, 분석 이외에 분리 정제를 목적으로 사용되지 않은 탓에 현재의 프로테오믹스 처럼 큰 역할을 하지 못한 것이 사실이다. 단백질의 화학적인 분자량 측정에는 다른 작은 생체 분자들처럼 MALDI와 분무 이온화법(electron spray ionization, ESI)이 이용된다. MALDI 분석에는 분석대상 물질의 비행시간을 측정하여 mass(m/z)를 분석하는 TOF(MALDI-TOF)형이 활용되고, ESI법(Nguyen et al., 1995; Apffel et al., 1998; Papac & Shahrokh, 2001)은 정제된 시료를 이온화시켜 분석하는 방법으로 크로마토그래피와 결합하여 사용할 수 있다. 프로테오믹스는 2DE가 preparative 용도로 사용되기 시작하고, 고정화된 pH gradient 기술 등이 접목되면서 매우 빠르게 발전하였다. 이와 더불어 2DE용 시료 추출방법과 컴퓨터를 이용한 고도로 정밀한 2D gel image 분석법이 개발되면서 빠른 속도로 발전하였다. 즉, pH 등(pI)으로 나타내는 단백질의 net charge에 따라 시료내의 단백질을 제1차로 분리하고(1DE), 분자량에 따라 재차 분리하는(2DE) 방법이다. 이 기술을 사용하면, 생체 시료의 특정 생리 조건에 따라 분석대상 특정 단백질 spot들의 분리 양상을 지도로 구성할 수 있다. 문제는 이렇게 발견된 단백질의 신규

성(novelty) 여부와 기능의 다양성을 알아내는 것이다. 이것을 위해 특정 단백질 spot을 gel로부터 분리하여 고순도 트립신(trypsin)을 처리한 펩티드 조각들을, MALDI-TOF 또는 SELDI-TOF 등의 단백질 질량분석기로 분석하고, 아미노산 서열을 결정한 후 단백질이나 게놈 데이터베이스를 생물정보학으로 찾아내어 단백질의 정체를 확인한다(Fig. 1). 다음 이 단백질의 신규성과 cDNA를 찾아 세포내에서 과다 발현시켜, *in vitro*에서 효소 활성을 분석하거나 해당 유전자의 적중(knock-out)동물이나 변이세포를 사용하여 그 유전자의 기능을 검증한다(Loo et al., 1999; Jungblut et al., 1999; Gevaert & Vandekerckhove, 2000; Nelson et al., 2000; Mann et al., 2001; Papac & Shahrokh, 2001; Hamdan et al., 2001; Lay et al., 2001; Laurell et al., 2001).

## 3. 단백질 칩

단백질 칩(protein chip)과 SELDI는 2DE와 함께 프로테오믹스 기술의 매우 중요한 분야로 활용되고 있다. DNA 칩처럼 항체나 항원, 또는 전사인자 및 ion-exchanger, hydrophobic surface를 칩 표면에 고정시켜 대단위로 검사하거나 표적분자 인식에 사용하는데, CIPHERGEN의 SELDI protein chip이 대표적이며(Hampel et al., 2001; Verma et al., 2001; Wulfkuhle et al., 2001; Paweletz et al., 2001; Fung et al., 2001; Issaq et al., 2002; Wu et al., 2002; Li et al., 2002), 여기에는 His-tagged 단백질, GST-fusion 단백질 등을 target 단백질로 활용하고 있고, 이를 이용하면 극미량의 샘플에서 이것과 결합할 수 있는 관련 단백질을 분리할 수 있다. 직접 SELDI/MS를 이용하여 질량과 데이터베이스를 이용한 펩티드 분석도 가능하다. 단백질 칩은 진단뿐 아니라, 특정 단백질의 정제에도 활용이 가능하다. 실제로 Biocore 같은 기기는 단백질 칩 기술의 대표적인 성과로서 단백질간, 또는 단백질과 물질들의 결합 kinetics, 정량분석을 가능하게 하는 분석기기이다. 중요한 것은 칩에 붙이는 단백질 탐침의 특이성, 안정성 그리고 칩 표면에 coating하는 기술이다. 단백질 칩과 SELDI를 ProteinChip System이라고 부르며, 단백질뿐만 아니라 펩티드와 저분자량 물질 등의 분석에도 사용될 수 있다. 이들 공정의 대부분은 일련의 부착(binding)과 세척(washing)과정을 동반한다. 준비된 생물학적 시료(단백질)를 미량( $\mu$ L)으로 ProteinChip array에 올려놓으면 화학적으로 특별히 표면 처리되었거나 생화학분자가 covalent하게 부착된 array의 표면에 붙게 된다. Sample 안의 일련의 단백질의 특별한 포착(specific capture)이 간단한 화학적 상호작용(즉, reverse phase, ion exchange, metal ion) 또는 단백질간의 상호작용(affinity capture) 등을 통해 일

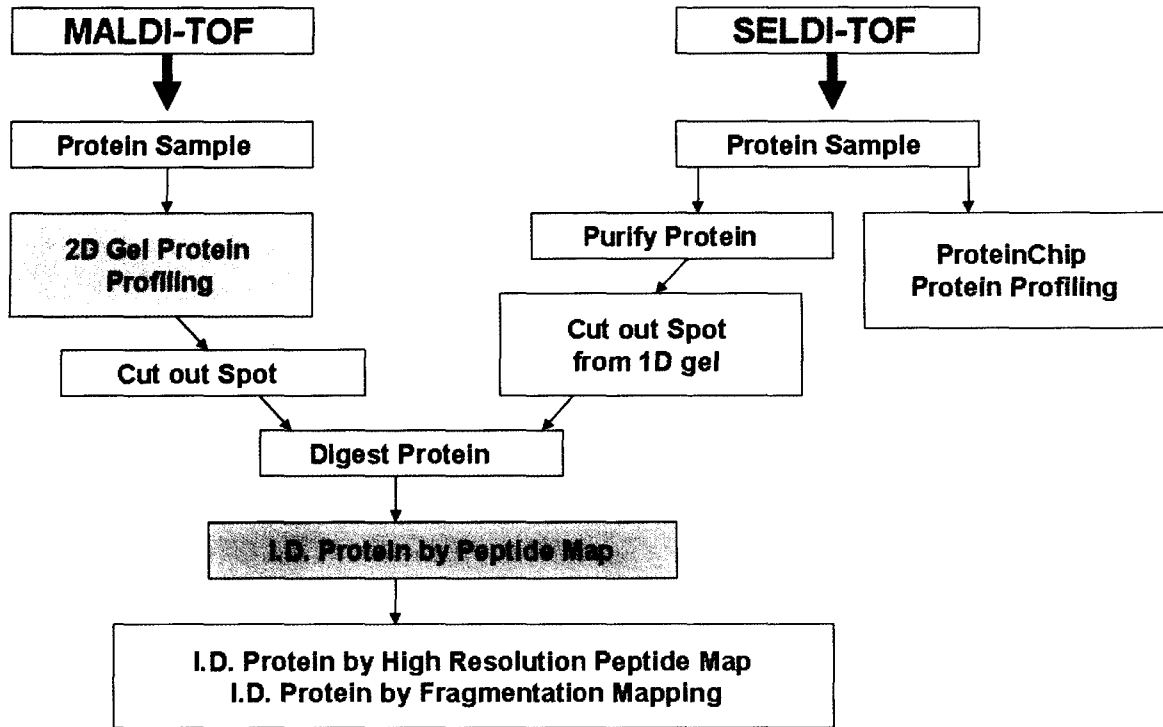


Fig. 1. Scheme of proteomics.

**Surfaces by Chemistry:**



**Surfaces by Biology:**

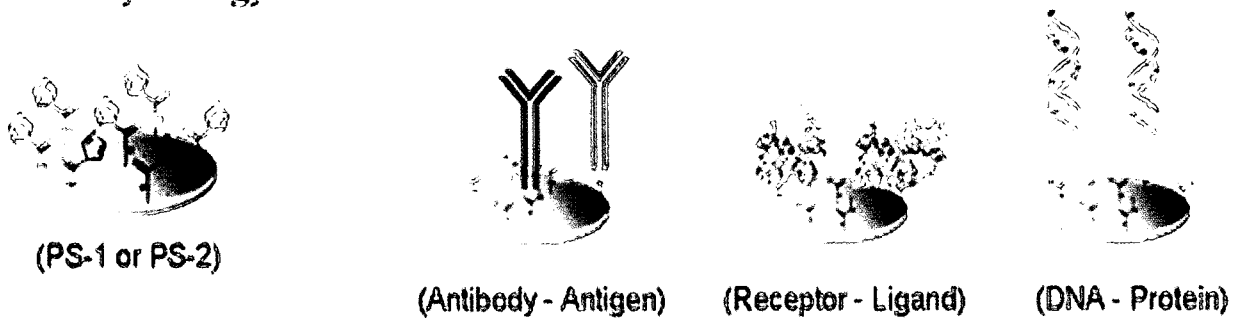


Fig. 2. Types of chip surface for affinity binding.

어난다(Fig. 2). 부착과 세척 후 칩 표면에 보존된 시료에 에너지 흡수물질(energy absorbing molecule, EAM) 용액을 공급해 주고, 이 유기용액에 녹인 EAM을 주입하여 단백질을 EAM과 함께 용액 속에 녹인다. ProteinChip 위의 용액이 마른 후, 과량의 EAM과 단백질(또는 분석물질)이 결합을 형성하며, EAM은 시료의 이온화를 증대하는데 필수적이다. 이렇게 하여 만들어진 금속성 칩 위의 시료는 Mass Spectrometry 분석을 위하여 ProteinChip Reader에 옮겨지고 여러 번의 레이저 빔이 특정 부분에 쏘아져, 먼저 이온상태로 그리고 고체를 기체상태로 만들어 시료를 승화시킨다. ProteinChip Reader는 분석물질의 비거리(time of flight)를 기록하고 이런 측정으로부터 고도의 정확한 분자량이 얻어진다. SELDI의 특성은 crude한 생물 시료들을 labeling이나 화학적 변화를 주지 않고 직접 잡아 감지하고 분석할 수 있는 데 있다. ProteinChip software는 ProteinChip arrays에 있는 시료로부터 모든 양상의 데이터를 조절하고, 분석과 해석 등을 가능하게 한다. 더 나아가 SELDI는 일련의 on-chip 효소적 진행과정(예, deglycosylation, peptide mapping)을 이용하여 단백질 특성분석 연구도 가능하다. 더불어, 간단히 몇 일 안에 수 백개의 시료를 screen할 수 있는 장점 등이 있다. SELDI system을 이용하는데 크게 profiling과 protein identification으로 나뉜다. ProteinChip 상에서 protein immunoassay, protein-protein interaction, DNA- or RNA-binding protein assay, metal-protein binding 또는 ion exchange에서 부분적 정제 등을 수행할 수 있다.

#### 4. 데이터베이스와 응용

프로테오믹스 연구에서 가장 중요한 자원 중의 하나는 샘플을 2DE로 분석한 전형적인 패턴이나 각종 펩티드의 mass-finger printing을 저장하고 이를 기반으로 동 분야 연구진들이 활용할 수 있게 데이터로 구축하고 활용하는 데이터베이스 체계이며(Bairoch, 1997), 약물 또는 독성물질의 표적으로 확인된 단백질의 신규성 유무 판별에도 매우 중요하게 활용된다. 특히, 단백질 발현의 profile을 만들어 임상시험이나 전임상 독성연구 등에 활용함은 매우 중요하다. 이러한 단백질 발현 양상이 특정 약물에 대하여 얻어질 경우 부작용의 예측이나 약리 효능 분석, 내성 연구 및 내성 회피 표적을 발굴해 낼 수 있다. 현재 website에는 프로테오믹스 분석을 위한 여러 가지 정보가 가용하다. 이들 중 대표적인 것이 NCBI 또는 SwissProt으로써 2DE 패턴을 샘플 origin 별로 구분하여 구축한 것이다. 현재 기술상의 문제점으로는 샘플원의 분석에 따른 재현성 문제로 각종 시료에 대한 표준화된 전처리(예, 용

액화 등)와 2DE 분석조건 등의 구축이 필요하다고 사료된다. 프로테오믹스의 주요 적용대상 중 하나는 각 샘플(세포, 조직, 체액 등) 처리시 나타나는 다양한 표현형 차이의 패턴을 비교할 수 있는 방법을 제공하는 것이다. 지노믹스와 프로테오믹스간 가장 큰 차이점은 methylation, glycosylation, phosphorylation, farnesylation 등 단백질만이 갖는 변형 패턴의 규명이 가능하다는 점이다. 이러한 변형 패턴은 그 단백질의 기능을 결정짓는 요인이므로, 실질적으로 이것에 근거하여 단백질의 식별과 특성 연구를 할 수 있는 것은, 프로테오믹스만이 갖는 핵심기술인 것이다. 이러한 변형은 세포분열, 감염, 질병, 외부에서 투여된 독성물질 등에 의해 다양하게 일어나므로, 프로테오믹스를 이용하여 이를 분석하는 것은 대단히 중요한 의미를 가진다. Quantitative 프로테오믹스 기술은 세포의 상태별로 특정 단백질의 분포와 농도 차이 변화를 *in vivo*에서 표지한 후 MALDI-MASS를 사용하여 분석하는 기술이다(Mann 1999). 이 방법으로 한 유전자로부터 만들어지는 유사한 단백질 류를 효과적으로 정량할 수 있으며 yeast와 박테리아 등의 배양시 특정 단백질을 tagging하면 성장조건에 따른 분포 변화를 정량할 수 있다. Protein-protein interaction에서 프로테오믹스를 활용하면 세포내 각종 단백질들 간의 결합이나 상호작용을 파악하는데 중요한 정보를 얻을 수 있다. 예를 들면, G-protein 관련 신호전달 과정에서 각 단백질들이 일련의 oligomerization을 하거나, 그들 간의 비공유결합을 2DE (native gel)로 분석하면, yeast two-hybrid system이나 Western blotting에 비해 훨씬 간편하게 단백질간의 관계를 파악할 수 있다(Godovac-Zimmermann et al., 1999).

### 생식생물학과 프로테오믹스

#### 1. 프로테오믹스를 이용한 생체 질병 원인 단백질의 탐색

프로테오믹스를 이용한 암연구 등이 활발하였다. 예를 들면, Jungblut 등(1999)은 암 조직의 일부를 2DE로 분석하여, 암의 진전에 따라 발현이 증가되는 단백질을 식별하였고, 이 단백질이 calgranulin B(calprotectin)임을 밝혀낸 바 있다. 이와 관련하여 현재까지 Myers 등(1995)은 60 여개의 암 세포주에 대하여 2DE 데이터베이스를 개발한 바 있으며, 이들 단백질 spots과 약 4,000 여개의 약물간의 관계를 설정한 바 있다. 감염성 질환 연구 예로는 프로테오믹스를 사용하여 폐결핵(tuberculosis, TB)의 주요 원인인 mycobacterium의 2DE 지도 분석과 이들 균주들에 대한 proteome 연구용 데이터베이스가 구축되었다(Mollenkopf et al., 1999). 이러한 전염성 균주들을 내성과 비내성 등으로 구분하여 각각의 proteome 분석을 실

시한 결과 약 700여종의 특정 단백질들의 존재가 확인되었으며, 이들 중 일부는 TB의 진단과 치료에 중요한 단서로 이용되고 있다. 항 비만 관련 연구로 obese mice들의 peroxisome proliferation activator regulator(PPAR) 전사인자들의 isoform에 대한 proteome 분석을 항 비만 약물(예, WY14,643) 투여 전후를 통해 실시하여, 최소한 16개 spots의 단백질 군이 발현 증가됨을 확인하였고 이들 중 14개 spots들이 peroxisomal fatty acid 대사에 관여하는 단백질임을 확인한 바 있다. 이로써, 항 비만제의 작용기전이 peroxisome에서 지방산 산화( $\beta$ -oxidation)를 촉진함을 규명하였다(Edvardsson et al., 1999). 약물 독성 연구 분야에서는 2DE를 이용하여 단백질 발현의 정량적인 분석으로 약물(예, peroxisome proliferator, retinoic acid)의 영향과 세포에 대한 독성을 연구할 수 있다. 특히 타이레놀과 같은 진통제 성분으로 쓰이는 acetaminophen 간독성이나(Myers et al. 1995), poly-lactic acid의 임파세포 독성 및 페니실린과 알부민과의 결합 등(Marzocchi et al., 1995)이 조사된 바 있고, 이 밖에도 Src SH domain과 결합하는 저해제를 연구하고(Giulian et al., 2000), 네오마이신의 aminoglycoside와 HIV Tat 펩티드-TAR RNA 간의 결합도 프로테오믹스로 분석하는 기술적 방법들이 보고된 바 있다(Loo et al., 1999).

## 2. 프로테오믹스를 이용한 생식생물학 분야에서의 단백질의 탐색

생식학 분야에서 분자수준의 연구로써 단백질학의 가능성은 대단히 크다. 생식 기전 연구로는 생식작용에 관여하는 고환, 난소, 태반, 자궁내막, 수란관 등의 조직들에서 생식생물학적 독성물질의 효과나, 질한 상태 등에서 호르몬이나 cytokine의 효과를 관찰하여 이들 과정에 어떻게 관여하는지를 규명할 수 있다. 특히 착상 부전이나 유산 등을 일으키는 원인 단백질을 조사할 수 있다(Shetty et al., 1999). 착상 실패, 유산, 불임과 다낭성 난소증후군(polycystic ovary syndrome) 등을 포함하는 질병들 역시 조사될 수 있다. 많은 질병들 중, 예를 들면, 자궁내막증(endometriosis)은 그 유전학적 기원이 필요치 않은 단백질들의 비정상적 발현과 병소 부위에 유래한다. 더 나아가, 월경주기 또는 생식체(gamete) 성장 같은 특정 단계별로 일어나는 일들이 역시 증명될 지도 모른다. 이제까지 생식수관(reproductive tract)의 전체 조직 중 조사된 단백질 연구들은 거의 없다. 그러나 인체 자궁내막 조직에 대한 단백질학의 연구가 가능성을 제시하였다(Byrjalsen et al., 1999). 세포수의 과형성(hyperplasia)과 선암(adenocarcinoma)의 새로운 biomarker에 대한 연구를 통해 연구자들은 예상치

못했던 단백질들이 상당히 많다는 것이 밝혀졌다. 이 단백질들 중 몇 가지가 발견되었고, 이러한 특별한 분석방법을 이용하여 조기진단, 예측 또는 자궁내막증 질병의 처리시 선택에 대한 정립을 가능케할 것이다. 인간 배아 연구가 도덕적 문제로 진행될 수 없었으나, 1990년대 초기에 Keith Latham과 Davor Solter는 쥐 배아세포 분화를 특성화하였다. 그들은 초기 배아세포의 단백질 지도를 완성하였고, 1-cell과 2-cell 단계에서 일어나는 단백질 합성에서 과도한 재편성(reprogram)을 분석하였다(Latham et al., 1991). 8-cell 핵들에서 핵을 빼낸 1-cell 배아세포로 핵치환 후 단백질 합성에서 변화가 입증되었고(Latham et al., 1994) 배아세포의 다른 영역에서는 단백질 합성의 차이 역시 조사되었다(Latham et al., 1993). 그러나 이러한 연구에서 각 단백질 spots을 확인하지는 못하였다. 고도의 민감한 단백질 서열분석에 대한 새로운 기술이 개발됨에 따라 이 과정에 참여하는 단백질들의 성질을 결정하는 것은 매우 흥미로운 일이 될 것이다.

특히 수정 후에 일어나는 핵의 재편성을 포함하는 난자의 세포질 구성요소의 발견과 배아세포와 배아 줄기세포간의 단백질 수준에서의 차이들은 매우 중요할 것이다. 최근의 작업들 역시 쥐의 배아세포 발생에서 각각의 단계별로 지도화되었고 확실히 이런 접근이 매우 민감하다는 것을 명확히 보여주고 있다. 20개의 배아세포들이 전체 proteome의 시각화에 적절한 양이라 사료되고 하나의 배아세포를 분석함으로써 나타나는 주요 단백질들도 관찰되었다(Sasaki et al., 1999). 이것은 실험에서 인체에 어떤 부족한 물질을 알아내는데 매우 중요하며, 인간배아를 연구하는데 있어 역시 매우 흥미로운 결과일 것이다. 배우자 연구에서는, 유전공학적 생식체 피임 백신연구소(The Center for Recombinant Gamete Contraceptive Vaccinogens)가 인간 정자의 단백질 지도를 그리려는 중장기 업무가 시작되어 왔고, 정자 세포들은 약 1,400개의 다른 단백질 군들을 포함하고 있다고 알려졌다(Naaby-Hansen et al., 1997). 이를 이용하여 불임 남녀들의 혈청내 항 정자 항체에 의해 인식되는 단백질이 어떤 것인가를 확인할 수 있었다(Shetty et al., 1999). 이들의 역할을 연구하게 되면 불임 치료를 가능하게 할 수 있는 근거가 마련될 것으로 기대된다(Brewis, 1999). 다른 예로, 기능을 연구하는데 사용되는 프로테오믹스는 일차적 투명대 상호 작용(primary zona interaction) 동안 배우자 인식에 상응하는 정자 단백질을 알아내는 것도 포함된다. 수정시 분자적 수준에서 일어나는 현상은 중요한 단백질의 번역 후 변형에 의존하며, 그러므로 프로테오믹스 연구는 일반적 DNA/RNA 기술을 사용하는 것보다 훨씬 많은 정보를 제공할 것으로 사료된다.

생식생물학·생식내분비학 분야에서, 호르몬, 성장인자, 세포분열 조절인자, 세포자연사 인자의 분석 등은 필수적이고 또 주로 ELISA에 의해 행해지고 있다. 그러나, 다양한 단백질의 변동 상황을 적은 시료로, 동시에 분석 가능한 방법으로 프로테오믹스를 이용한 microarray analysis가 대두되었다(Wiese et al., 2001). 또한 time-resolved fluorometry for multi-analyte immunoassay를 이용하여 multiplex micro-ELISA를 개발하여(Scorilas et al., 2000), 짧은 시간, 적은 시료를 이용하여 동시에 다량의 분석물을 측정하기에 이르렀다. 이는 생식 호르몬의 정량에 이용할 가능성이 시도되고 있어, 조만간 성주기, 일간 주기적, 계절적 변화 등에 다양하게 이용될 가능성이 높아졌다. 이는 곧 호르몬의 정량정성 분석에 획기적인 변화를 초래할 것으로 예상된다.

## 결 론

프로테오믹스는 충분히 간질환, 심장질환, 몇몇 종류의 암 등의 다른 의학 분야 연구에서 그 잠재적 중요성이 명백하게 언급되었다(Pennington et al., 1997). 생식생물학의 중요성이 대두되면서, 많은 연구들이 발표되고 단백질을 대상으로 유전자 기능을 연구하는 프로테오믹스 연구를 접목시키려는 연구가 시도되고 있다. 프로테오믹스는 기능 단백질들의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정하여 미세한 생식과정에서 단백질들의 발현 양상 변화를 정확하게 관찰할 수 있을 것이다. 그 결과, 생체내 유전자 발현의 궁극적인 양상을 규명할 수 있고, 또한 유전자, 단백질 및 질병간의 상관관계 정보를 제공한다. 따라서 대량 발굴 탐색이 가능한 2차원 전기영동 분석과 MALDI-TOF 또는 protein chip array와 SELDI-TOF에 의한 단백질 분자구조 분석기술 및 이들을 지원하는 생물정보학은 매우 복잡하고, 다양한 단백질 및 호르몬, 성장요인 등의 변화, 환경의 변화에 따르는 단백질 및 중간대사물질의 변화를 탐색함으로써 종합적인 분석과 기전의 설명이 가능할 것이며, 표적 단백질 발굴에 적절한 이용이 가능할 것이다. 또한 지속적으로 proteomic 데이터와 genomic 데이터가 모아지면 세포와 유기체의 일반적 기능의 이해를 확장시키고, 세포의 대사과정과 질병에 통찰력을 줄 것이며, 진단 및 치료 개발에 새로운 기회를 제공할 것이다.

## 인용문헌

- Apffel A, Chakel J, Udiavar S, Swedberg S, Hancock WS, Souders C, Pungor Jr E (1998) Application of new analytical technology to the production of a "well-characterized biological". *Dev Biol Stand* 96:11-25.
- Bairoch A (1997) Proteome Databases, In: Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, and Hochstrasser DF (eds.), *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer, Berlin, pp 93-148.
- Blackstock WP, Weir MP (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 17: 121-127.
- Brewis IA (1999) Proteomics in reproductive research: the potential importance of proteomics to research in reproduction. *Hum Reprod* 14:2927-2929.
- Byrjalsen I, Larsen PM, Fey SJ, Nilas L, Larsen MR, Christiansen C (1999) Two-dimensional gel analysis of human endometrial proteins: characterization of proteins with increased expression in hyperplasia and adenocarcinoma. *Mol Hum Reprod* 5:748-756.
- Dettemer K, Hammock BD (2004) Metabolomics-a new exciting field within the "omics" science. *Environ Health Perspect* 112:A396-A397.
- Edvardsson U, Alexandersson M, Brockenhuus VL, Nystrom AC, Ljung B, Nilsson F, Dahllof B (1999) A proteome analysis of livers from obese (ob/ob) mice treated with the peroxisome proliferator WY14,643. *Electrophoresis* 20:935-942.
- Fiehn D (2002) Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48:155-171.
- Fung ET, Enderwick C (2002) ProteinChip clinical proteomics: computational challenges and solutions. *Biotechniques Suppl*: 34-8, 40-1.
- Gevaert K, Vandekerckhove J (2000) Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21:1145-1154.
- Giuliani A, Sirabella P, Benigni R, Colosimo A (2000) Mapping protein sequence spaces by recurrence quantification analysis: a case study on chimeric structures. *Protein Eng* 13: 671-8.
- Graves DJ (1999) Powerful tools for genetic analysis come of age. *Trends Biotechnol* 17:127-134.
- Godovac-Zimmermann J, Soskic V, Poznanovic S, Brianza F (1999) Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 20:952-961.
- Hamdan M, Bordini E, Galvani M, Righetti PG (2001) Protein alkylation by acrylamide, its N-substituted derivatives and

- cross-linkers and its relevance to proteomics: a matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry study. *Electrophoresis* 22:1633-1644.
- Hampel DJ, Sansome C, Sha M, Brodsky S, Lawson WE, Goligorsky MS (2001) Toward proteomics in uroscopy: urinary protein profiles after radiocontrast medium administration. *J Am Soc Nephrol* 12:1026-1035.
- Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D (2002) The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 292:587-592.
- James P (1997) Of genomes and proteomes. *Biochem Biophys Res Commun* 231:1-6.
- Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Muller EC, Sokolowska-Kohler W, Grabher G, Stoffler G (1999) Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 20:2100-2110.
- Laurell T, Marko-Varga G, Ekstrom S, Bengtsson M, Nilsson J (2001) Microfluidic components for protein characterization. *J Biotechnol* 82:161-175.
- Lay JO Jr (2001) MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* 20:172-194.
- Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D (1991) Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I: Extensive reprogramming at the one and two-cell stages. *Development* 112:921-932.
- Latham K, Beddington, RS, Solter D, Garrels JI (1993) Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. II: Differentiation of endoderm, mesoderm, and ectoderm. *Mol Reprod Dev* 35:140-150.
- Latham KE, Garrels JI, Solter D (1994) Alterations in protein synthesis following transplantation of mouse 8-cell stage nuclei to enucleated 1-cell embryos. *Dev Biol* 163:341-350.
- Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW (2002) Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast. *Cancer Clin Chem* 48:1296-1304.
- Loo JA, DeJohn DE, Du P, Stevenson TI, Ogorzalek Loo RR (1999) Application of mass spectrometry for target identification and characterization. *Med Res Rev* 19:307-319.
- Mann M (1999) Quantitative proteomics [news]. *Nat Biotechnol* 17:954-955.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70:437-473.
- Marzocchi B, Magi B, Bini L, Cellesi C, Rossolini A, Massidda O, Pallini V (1995) Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of human serum albumin modified by reaction with penicillins. *Electrophoresis* 16:851-853.
- Mollenkopf HJ, Jungblut PR, Raupach B, Mattow J, Lamer S, Zimny-Arndt U, Schaible UE, Kaufmann SH (1999) A dynamic two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database of the mycobacterial proteome via Internet. *Electrophoresis* 20:2172-2180.
- Myers TG, Dietz EC, Anderson NL, Khairallah EA, Cohen SD, Nelson SD (1995) A comparative study of mouse liver proteins arylated by reactive metabolites of acetaminophen and its nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide. *Chem Res Toxicol* 8:403-413.
- Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC (1997) Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biol Reprod* 56:771-787.
- Nelson RW, Nedelkov D, Tubbs KA (2000) Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach. *Electrophoresis* 21:1155-1163.
- Nguyen DN, Becker GW, Riggan RM (1995) Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology. *J Chromatogr A* 705:21-45.
- Papac D, Shahrokh Z (2001) Mass spectrometry innovations in drug discovery and development. *Pharm Res* 18:131-145.
- Paweletz CP, Trock B, Pennanen M, Tsangaris T, Magnant C, Liotta LA, Petricoin EF (2001) Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis Markers* 17:301-307.
- Pennington SR, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Dunn MJ (1997) Proteome analysis: from protein characterisation to biological function. *Trends Cell Biol* 7:168-173.
- Sasaki R, Nakayama T, Kato T (1999) Microelectrophoretic analysis of changes in protein expression patterns in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 60:1410-1418.



- Scorilas A, Bjartell A, Lilja H, Moller C, Diamandis EP (2000) Streptavidin-polyvinylamine conjugates labeled with a europium chelate: applications in immunoassay, immunohistochemistry, and microarrays. *Clin Chem* 46:1450-1455.
- Shetty J, Naaby-Hansen S, Shibahara H, Bronson R, Flickinger CJ, Herr JC (1999) Human sperm proteome: immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biol Reprod* 61:61-69.
- Verma M, Wright GL, Hanash SM, Gopal-Srivastava R, Srivastava S (2001) Proteomic approaches within the NCI early detection research network for the discovery and identification of cancer biomarkers. *Ann N.Y Acad Sci* 945: 103-115.
- Weckwerth W (2003) Metabolomics in systems biology. *Ann Rev Plant Biol* 54:669-689.
- Wiese R, Belosludtsev Y, Powdrill T, Thompson P, Hogan M (2001) Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform. *Clin Chem* 47:1451-1457.
- Wu W, Hu W, Kavanagh JJ (2002). Proteomics in cancer research. *Int J Gynecol Cancer* 12:409-423.
- Wulfskuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Jrock TB, Steeg PS, Petricoin EF (2001) New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 1:1205-1215.