

α -Casein의 인산화 위치 규명을 위한 티타늄 다이옥사이드(TiO_2) 방법의 최적화

김혜정 · 박자혜 · 백문창[#]

경북대학교 의과대학 분자의학교실

(Received September 8, 2008; Revised October 8, 2008)

Optimization of TiO_2 Method to Identify the Phosphorylation Sites of α -Casein

Hye-Jeong Kim, Ja-Hye Park and Moon-Chang Baek[#]

Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University, Deagu 700-422, Korea

Abstract — Phosphorylation plays the most important role in cell signaling mechanism. Various methods to identify the phosphorylation sites of proteins using tandem mass spectrometry (MS/MS) have been reported recently. Furthermore, the enrichment strategy such as Titanium dioxide (TiO_2) method should be combined with MS/MS analysis to effectively identify phosphorylation sites. It is necessary to optimize phosphopeptide-enrichment strategy, TiO_2 method in this study, due to the low amount of phosphorylated form followed by analyzing them by MS/MS. To evaluate the several conditions to enrich phosphopeptides using TiO_2 method, we used α -casein as a standard phosphoprotein and analyzed a representative phosphopeptide (VPQLEIVPNpSAEER) peak of MS spectrum. Batch is better than column method for binding and 300 g/l DHB in loading buffer is better than lower concentration of DHB. 3% TFA and pH 10.5 shows high efficiency of phosphopeptide-enrichment for washing and elution steps, respectively. Finally we identified various efficient conditions of phosphopeptide-enrichment method using TiO_2 . This optimized method would assist in reliable identifying thousands of phosphorylation sites existed in low abundance from various complex proteins.

Keywords □ TiO_2 method, phosphorylation sites, α -casein

신호전달 과정에서 일어나는 단백질의 인산화는 가장 널리 알려진 전사 후 수식 중의 하나이며 세포의 분할, 이주, 정착(cell division, migration, adhesion) 등의 많은 기능에 관여하는 신호 전달 메커니즘 조절에 있어서 중요한 역할을 한다. 이러한 인산화 단백질을 동정하기 위한 노력은 지난 수십 년 동안 계속되어왔다.¹⁻³⁾ 전통적으로는 동위원소를 이용하여 단백질을 인산화를 시킨 후, 이를 트립신 처리하여 펩타이드로 만든 다음, HPLC로 펩타이드를 분리한다.⁴⁾ 분리된 각각의 분획들의 일부를 MALDI-TOF를 이용하여 포스포 펩타이드를 서열을 확인하고, 인산화 된 위치를 알기 위해, 일부 시료를 Edman degradation 방법으로 절단되어 나온 아미노산 분획들을 받아 이를 liquid scintillation counter를 이용하여 펩타이드 서열을 검증하고 위치를 확인할 수 있었다.⁴⁾ 하지만 최근에는 nano-LC MS/MS 장비의 개발로⁵⁻⁹⁾ 동위원소를 이용하지 않고, 적은 시료로부터 인산

화 된 펩타이드 및 인산화 위치까지 발견할 수 있게 되었다. 이러한 방식을 이용하여 세포 내에서 일어나는 신호 전달 기전을 시스템 수준에서 밝히는 연구가 가능하게 되었다.¹⁰⁻¹²⁾ 그러나 인산화 단백질의 존재량 자체가 적고 인산화 자체의 가역성과 이온화가 약하게 되는 특성 때문에 인산화 단백질 연구에 많은 어려움이 존재한다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 질량분석기로 분석하기 이전에 인산화 단백질만을 따로 농축(enrichment)하는 과정이 필요하게 되었다.^{13,14)}

지금까지 화학물질을 이용하거나 항체를 이용하거나 친화성을 이용하여 인산화 단백질을 농축해내는 방법들이 기존에 많이 보고되었으며 그 중에서도 티타늄 다이옥사이드(TiO_2)를 이용한 농축법이 널리 사용되어, HeLa cell에 EGF를 시간별로 처리하여 단백질의 인산화 정도를 비교한 연구,¹⁰⁾ fission yeast에서 인산화 단백질을 농축한 연구¹²⁾ 등 지금까지 많은 연구가 보고되고 있다. 이처럼 단백질 농축 방법과 질량분석기를 함께 사용하게 되면 매우 효율적으로 인산화 단백질을 동정해 낼 수 있지만 아직까지 질량분석기로 분석하기 이전에 이러한 인산화 단백질 농축 과정을 더 효율적으로 수행하기 위한 TiO_2 의 조건들에 대한

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-420-4948 (팩스) 053-426-4944
(E-mail) mcbaek@knu.ac.kr

비교실험에 대한 보고는 미흡하여, 본 연구에서는 각 조건을 비교하여 조건들 중에 최적화 된 방법으로부터 동일량의 시료를 사용하더라도 더 많은 인산화 단백질을 동정해 낼 수 있음을 입증하였다. 본 연구에서 최적화 된 인산화 단백질 농축 방법을 이용한다면 여러 신호 전달 과정에 관여하는 많은 인산화 단백질 연구에도 좋은 영향을 미칠 것으로 기대된다.

실험 방법

인산화 단백질의 트립신 절단

본 실험에서는 인산화 단백질의 농축 정도를 비교하기 위하여 대표적인 인산화 단백질인 α -casein(5 pmol)을 이용하였다. 먼저 단백질을 펩타이드로 분해하는데 샘플에 50 mM ammonium bicarbonate를 넣고 90°C에서 20분간 변성시킨 후 트립신 (Promega, Madison, WI, USA)을 넣고 37°C에서 12시간 정도 반응시킨 후 감압 건조기(speed vac dryer)에서 건조를 시켰다.

인산화 단백질의 농축-TiO₂

기준에 인산화 단백질 농축을 위한 TiO₂ 방법은 먼저 Top Tip TiO₂(Glygen, Columbia, MD, USA)을 20 μ l of 3 g/l DHB in 80% ACN/0.1% TFA, NH₃ water in 40% ACN(pH 10.5), 0.1% TFA 버퍼에 각각 씻어준 후 마이크로컬럼에 로딩하고, 절단된 펩타이드를 30 g/l DHB in 80% ACN/0.1% TFA 버퍼에 녹여 resin과 상온에서 한 시간 정도 결합을 시킨다. 그 다음 10% ACN in 0.1% TFA, 80% ACN/0.1% TFA로 각각 세척하고 NH₃ water in 20% ACN(pH 10.5), NH₃ water in 40% ACN (pH 10.5)로 elution을 받고 난 다음 0.1% formic acid를 첨가하여 산성화 시킨다.

TiO₂ 방법의 최적화

TiO₂ 방법 중에서 펩타이드와 resin을 결합시키는 단계에서 기존의 방법처럼 컬럼에서 결합하는 방법과 튜브에서 결합시킨 뒤에 로딩하는 방법을 비교하였으며 또한 펩타이드를 녹인 버퍼의 DHB의 농도를 각각 3, 30, 300, 500 g/l DHB in 80% ACN/0.1%로 비교를 하였다. 뿐만 아니라 세척 단계에 있어서 TFA의 농도를 3%, 6%로 높게 하여 실험을 진행하였으며 elution 단계에서는 pH를 8.5와 12.5로 변경시켜 비교 실험을 진행하였다.

나노 초 고성능 액체 크로마토그래피(nano Ultra Performance Liquid Chromatography)

모든 샘플은 질량분석기 분석 이전에 C18 nanocolumn(75 μ m id, 150 mm length, 1.7 μ m particle size, Waters)을 이용하여 분리 되었으며 분리에 사용된 버퍼는 A: H₂O+0.1% formic acid; B: ACN+0.1% formic acid이다. LC 내의 버퍼는 분당 300 nl의

유속으로 처음에는 1% B 버퍼에서 5% B(5분)로 후에 25% B (10분), 60% B(30분), 99% B(35~55분)로 차례로 증가시킨 후 다시 처음의 농도인 1% B(60~80분)로 흘려준다.

질량분석기

분석은 nanoUPLC와 연결된 nano-전자분부(ESI) 사극자(quadrupole) 이온 비행 시간차 분석기(TOF) 질량분석기를 사용하여 이루어졌다(Q-TOF Premier, Waters). Data는 충돌관(collision cell)에서 낮은 에너지에서 높은 에너지로 주기적으로 충돌 에너지를 변환 시킬때 사극자에서 모든 이온을 방출하게 되는 MS^B(Expression) mode로 받아졌다. Scan은 1초 간격으로 이루어 졌으며 MS spectra는 m/z 50에서 m/z 1990까지 받아졌다. Mass의 정확도는 LockSpray에서 reference인 GFP(Glu-Fibrinopeptide B, Sigma)를 이용하여 30초 간격으로 스캔함으로써 유지된다. 위 실험은 3회 반복 분석을 하여 결과를 도출하였다.

Data 변환(Data processing)

Data 변환과정 동안 소프트웨어는 각각의 precursor ion을 exact mass와 retention time에 근거하여 이에 대응하는 fragments ion과 비교하게 된다. 그 결과로 펩타이드가 동시에 elute된 경우라도 모든 검출된 이온의 정보를 얻을 수 있게 된다. 모든 실험 data는 Protein Lynx Global Server v2.2.5(Waters)를 이용하여 pkl file로 변환 되었고 이 결과를 바탕으로 MASCOT에서 IPI bovine 3.23 version에 대조되어 fixed modification에는 carbamidomethyl C, variable modification에는 oxidation M, Phospho STY로 선택하고 트립신 missed cleavage는 2개의 조건으로 search되었다.

실험 결과 및 고찰

세포 신호 전달에 중요한 인산화 과정이 중요하므로 이들의 인산화된 단백질과 또한 인산화된 위치를 확인하는 것은 신호 전달 연구에 필수적이다. 이를 위해 최근에 인산화 단백질을 농축하고, 이를 텐덤 질량분석기를 이용하는 연구가 본격적으로 이용되고 있다. 본 연구는 인산화된 펩타이드를 농축하는 방법을 최적화하는 것을 목적으로 하였다.

전반적인 인산화 펩타이드 농축 과정을 Fig. 1에 나타내었다. 본 연구에서 표준 인산화 단백질로써 α -casein을 이용하였고, 이를 트립신을 이용하여 펩타이드로 절단하였다. 절단된 펩타이드를 건조시킨 후 TiO₂ loading 버퍼에 녹여 resin과 반응시킨 후 결합하지 않은 인산화 되지 않은 펩타이드를 세척한 다음 인산화 펩타이드를 elution하고, 이를 건조 시켜 제염을 하고 A 버퍼에 녹인 다음 질량분석기로 분석하였다.

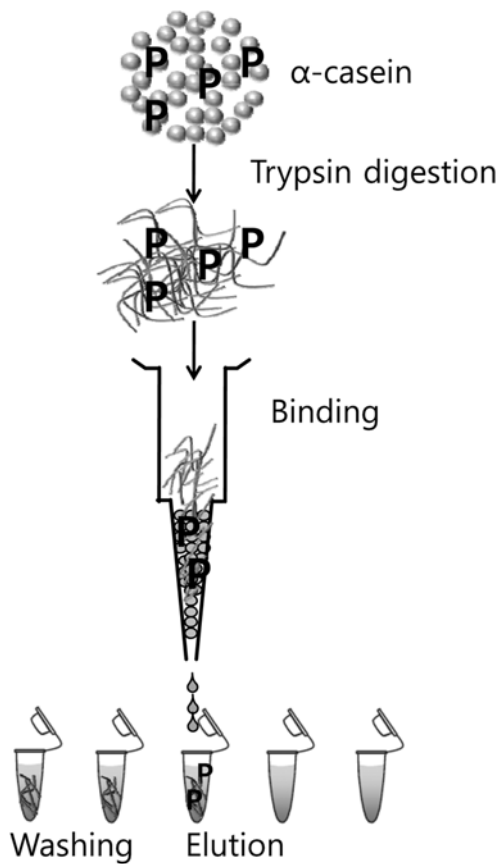


Fig. 1 – The scheme to represent an enrichment strategy of phosphorylated peptides using TiO₂ method.

분석결과, 총 이온 크로마토그램(total ion count)를 얻었고, 이를 noise peak을 제거하고 실제 count만을 보여주는 BPI(base peak intensity ± 0.1 Da)를 얻었다(Fig. 2A). 한 가지 예를 보여 주기 위해, 34.72분에 2가 charge($[M+2H]^{2+}$)로 m/z값 830.9를 확인하였고, 이를 MSe 방식에 의해 나타난 MS spectrum을 확인하였고, MS/MS 결과를 얻었다(Fig. 2B). 이를 PLGS 2.2.5 software를 이용하여 pkl file을 얻고, 이를 Mascot search를 통하여 인산화 펩타이드, VPQLEIVPNpSAEER를 동정하게 되었다. 이 펩타이드를 기준으로 이용하여 TiO₂ 방법의 조건을 최적화하는 데 이용하였다.

Binding 방법의 최적화

기존의 TiO₂ 방법은 resin을 마이크로컬럼에 충전시킨 후, 펩타이드를 흘려주어 결합시키는 방법(colume 방법)과, 이와 비교하기 위해 resin을 펩타이드를 원심분리용 튜브에서 미리 반응시킨 후, 이를 컬럼에 충전하는 방법(batch 방법)을 이용하였다. 그 결과는 Fig. 3에서 보는 것처럼 ion count가 175,534에서 377,737로 증가하는 것을 알 수 있었다.

Fig. 3의 두번째 컬럼에서 볼 수 있듯이 기존의 방법과 비교하여 샘플을 녹이는 버퍼의 DHB의 농도가 300 g/l이었을 경우, 인산화 펩타이드인 VPQLEIVPNpSAEER의 ion count가 최고치로 된 것을 알 수 있었다.

일반적으로 batch 방법은 colume 방법에 비해 affinity가 약한 펩타이드가 붙을 가능성이 크다. 예상한 대로 batch 방법이 특이

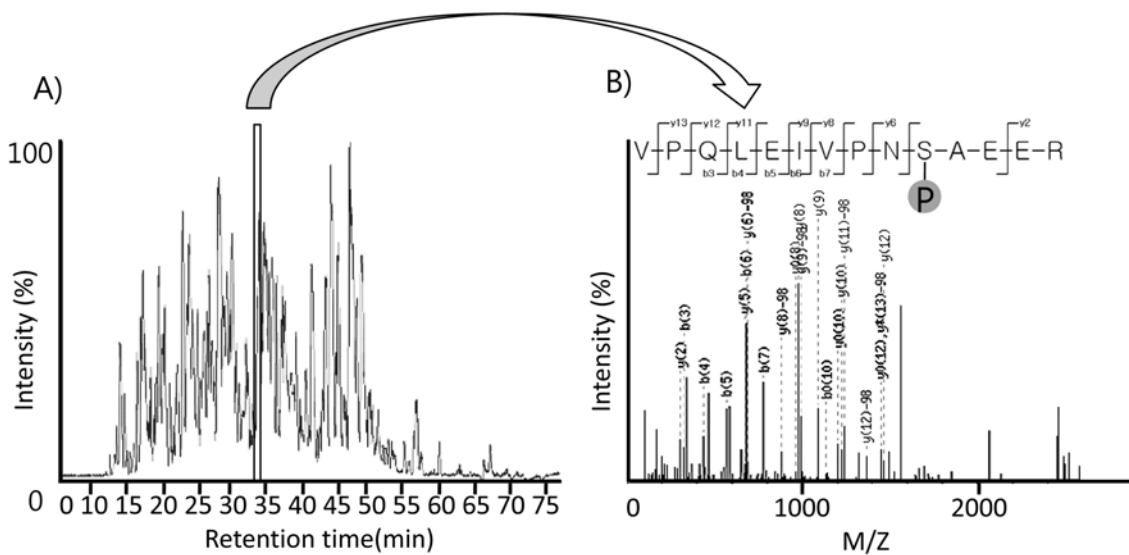


Fig. 2 – The identification of a phosphopeptide from α -casein. A) The BPI Chromatogram of tryptic peptides. α -Casein was digested by trypsin and the phosphopeptides were enriched by TiO₂ method. The phosphopeptides were analyzed by nano-UPLC Q-TOF Premier. The MS spectrum of base peak ion count chromatogram (BPI) was shown, which removed noise peak from a total ion count chromatogram. The x-axis indicates retention time (min) of nano-LC and y-axis indicates intensity of ion count (%). B) Tandem MS spectra of a phosphorylated peptide. The ion peak from 34.72 min of BPI spectrum was analyzed by tandem MS and the fragment ions were analyzed by MASCOT search software. The result of tandem MS spectra represents a phosphopeptide, VPQLEIVPNpSAEER.

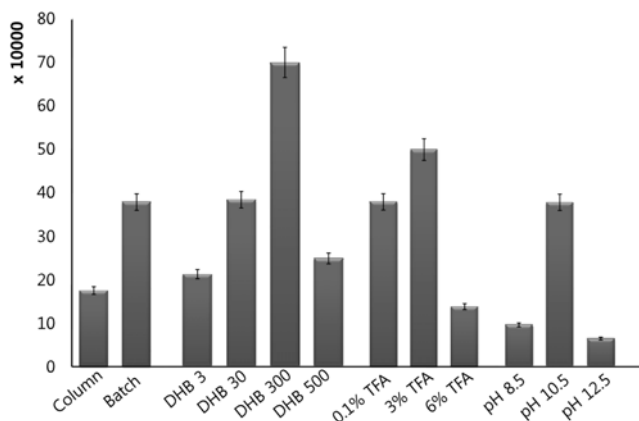


Fig. 3 – Comparison of various conditions to optimize TiO_2 method. The binding (column or batch) condition, concentration of binding buffer (DHB conc.), washing buffer (TFA conc.) condition and pH of washing buffer were compared to optimize a enrichment method using ion counts of a phosphopeptide, VPQLEIVPNpSAEER. The result of MS analysis was processed three times independently.

성은 전반적으로 떨어질 수 있으나 그 결합력은 극대화 시켰다. 하지만 이 방법에서 DHB를 이용하는 데 이는 상대적으로 결합력이 약한 비특이적인 펩타이드를 제거하기 사용하게 된다. 하지만 DHB의 농도가 높아짐(500 g/l)에 따라 phosphopeptide 까지 제거된 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험을 통해 batch 방법을 이용해서 최대한 많은 펩타이드를 결합시킨 후에 DHB 300 g/l를 이용하여 nonspecific하게 결합된 nonphosphopeptide를 제거할 수 있는 방법을 찾게 되었다.

Washing buffer의 최적화

TiO_2 resin과 펩타이드를 결합 시킨 후 비특이적으로 결합한 인산화 되지 않은 펩타이드를 제거하는 과정에서 사용하는 세척 버퍼의 TFA 농도를 0.1%에서 3%, 6%로 증가시켜 실험을 진행한 결과가 Fig. 3의 세 번째 컬럼에 나타나 있다. TFA 농도가 3%로 증가로 인해 인산화 펩타이드인 VPQLEIVPNpSAEER의 ion count가 377,737에서 498,372로 증가하는 결과를 확인하였고, 6%일 때는 137,985로 3%일 때 보다 효율이 좋지 않음을 알 수 있었다. DHB와 마찬가지로 비특이적으로 결합된 펩타이드를 제거하기에 3% TFA가 가장 효과적인 것을 알 수 있었다.

Elution buffer의 최적화

세척과정 후에 resin과 결합한 펩타이드를 떼내는 과정인 elution 단계에서 사용하는 버퍼의 pH를 8.5, 10.5, 12.5로 증가시켰을 때의 결과가 Fig. 3의 마지막 컬럼에 나타나 있다. 앞서 수행한 다른 조건 비교의 실험결과와는 달리 이 실험에서는 pH 8.5와 12.5에서 ion count가 현저하게 감소하였음을 알 수 있었다. pH를 이용하여 TiO_2 와 phosphopeptide 간의 이온 결합을 약화

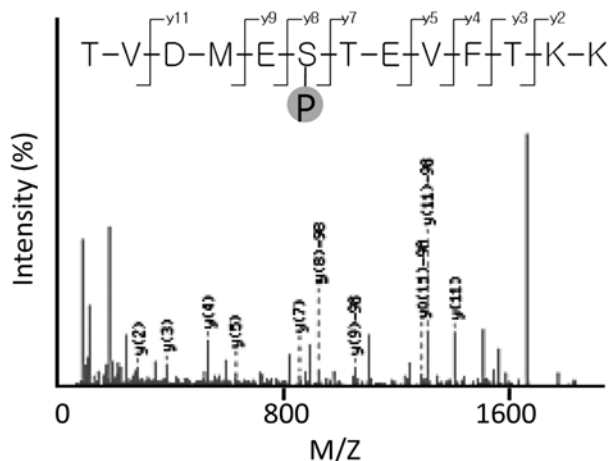


Fig. 4 – The tandem MS spectra of a phosphorylated peptide, TVDMEpSTEVFTKK. This phosphorylated peptide was not detected in traditional method but identified in optimized method. The MASCOT score of this peptide is 30.

시켜 elution 하는 데 있어서 예상한 것처럼 중성 pH에 가까운 8.5 보다는 알칼리성의 pH 10.5가 훨씬 효과적이었다. 하지만 pH 12.5와 같이 강알칼리 상태에서는 그 효율이 아주 떨어졌다. 아마도 강알칼리 상태에서 resin이나 phosphate group에 영향을 주어 그 효율이 떨어졌을 것으로 추론된다.

최적화 된 방법으로 TiO_2 를 이용한 인산화 단백질 농축 실험을 수행한 결과를 기존의 방법과 비교하여 Table I에 나타냈다. 기존의 방법으로 인산화 펩타이드, VPQLEIVPNpSAEER의 Mascot score는 16 이었고, 최적화 된 방법을 이용하였을 때 이의 score가 56으로 증가하였고, 또한 TVDMEpSTEVFTK라는 인산화 펩타이드도 높은 score(30)로 동정되었다.

질량분석기에 의해 인산화 된 위치를 규명 시에 인산화 된 경우 질량이 80 Da(인산화 그룹)이 증가하고, 또한 인산화 위치를 알기 위해서는 MS/MS에 의해 생성된 fragment ion들 중에서, Ser, Thr의 경우 그 아미노산의 원래 질량보다 80 Da 증가하는 패턴을 소프트웨어가 인식하여 그 위치를 결정하게 된다. 또한, 이렇게 질량분석기에 의한 분석 전에 인산화 된 펩타이드를 농축하는 것은 아주 중요하다. 왜냐하면, 질량분석기 특성상 인산화 되지 않은 펩타이드가 혼입되어 있는 경우, 인산화 된 펩타이드의 인산화 위치와 분석을 방해하기 때문이다. 이를 효과적으

Table I – The comparison of optimized method with traditional method using MASCOT score

Phosphorylated peptides	Mascot score	
	Traditional method	Optimized method
VPQLEIVPNpSAEER	16	56
TVDMEpSTEVFTKK	Not detected	30

로 농축하기 위해 많은 연구자들은 화학적, 항체 그리고 affinity를 이용한 방법들을 개발하였다. 그 중에서도 Ga(III), Fe(III)을 이용한 Immobilized Metal Affinity Chromatography(IMAC)가 많이 이용되어 왔다. 최근에는 TiO₂를 이용한 방법이 IMAC 방법의 대체하기 시작하였다. 이 TiO₂ 방법은 IMAC에 비해 인산화 펩타이드를 더욱 선택적으로 농축할 수 있기 때문이다. 이 방법을 더욱 효과적으로 이용하기 위해 본 실험 결과는 의의가 있다고 사료된다.

결 론

인산화 단백질 농축 방법인 TiO₂ 기법을 최적화하기 위해 본 연구를 수행하였고 그 결과 기존의 방법과 비교하여 더 효과적으로 농축할 수 있는 조건들을 찾을 수 있었다. 이는 적은 양으로 존재하면서 가역적인 반응을 나타내는 인산화 단백질의 연구에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2007-331-E00046).

참고문헌

- 1) 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).
- 2) Hunter, T. : Signaling 2000 and beyond. *Cell* **100**, 113 (2000).
- 3) Pawson, T. and Nash, P. : Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**, 445 (2003).
- 4) Baek, M. C., Krosky, P. M., He, Z. and Coen, D. M. : Specific phosphorylation of exogenous protein and peptide substrates

by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. Importance of the P+5 position. *J. Biol. Chem.* **277**, 29593 (2002).

- 5) Aebersold, R. and Mann, M. : Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198 (2003).
- 6) Chen, W. G. and White, F. M. : Proteomic analysis of cellular signaling. *Expert. Rev. Proteomics* **1**, 343 (2004).
- 7) Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and White, F. M. : Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* **20**, 301 (2002).
- 8) Mumby, M. and Brekken, D. : Phosphoproteomics: new insights into cellular signaling. *Genome Biol.* **6**, 230 (2005).
- 9) Rush, J., Moritz, A., Lee, K. A., Guo, A., Goss, V. L., Spek, E. J., Zhang, H., Zha, X. M., Polakiewicz, R. D. and Comb, M. J. : Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 94 (2005).
- 10) 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).
- 11) Villen, J., Beausoleil, S. A., Gerber, S. A. and Gygi, S. P. : Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1488 (2007).
- 12) Wilson-Grady, J. T., Villen, J. and Gygi, S. P. : Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J. Proteome Res.* **7**, 1088 (2008).
- 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) Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P., and Jorgensen, T. J. : Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 873 (2005).