

CHEMISTRY TOPICS 2

효소화학반응을 이용한 단백질체 맵핑

이현우 | 울산과학기술원(UNIST) 화학과, rhee@unist.ac.kr

서론

단백질은 현재 알려진 모든 생명체의 생화학반응을 매개하는 생명현상의 중추역할을 담당하고 있는 물질이다. 게놈 프로젝트(Genome project)에 의해서 사람세포에는 약 18,000가지의 서로 다른 단백질이 발현하는 것으로 알려져 있으며, 이렇게 발현된 단백질은 세포안에 존재하는 초미세공간(microenvironment)내의 자기만의 자리에 분포하면서 생체를 이루고 생명현상을 조절하고 있다. 생체분자분석기술과 이미징 기술의 발달로 현재 생물학자들은 이 많은 단백질들이 세포질 안에서 무질서하게 돌아다니는 것이 아니라, 주위에 존재하는 다른 단백질들과 긴밀한 네트워크를 이루면서 수십 나노미터보다도 작은 초미세구조(Ultrastructure)를 이루면서 존재하는 것이 점차 알려지고 있다. 이에 세포의 각기 다른 공간에서 초미세구조를 이루며 존재하는 단백질 구성체를 모두 알아내는 것은 현재 세포생물학 분야의 새로운 목표점이 되고 있다.

과연 어떠한 단백질들이 모여서 각기 다른 초미세구조를 이루고 있는가를 알아내는 것은 생명현상을 이해하는데 매우 핵심적인 정보가 되기 때문에 현재 많은 과학자들이 다양한 첨단 분석기술을 갖고 이 분야에 뛰어들고 있다. 이를테면 전자현미경 이나 혹은 초분해능 현미경 등의 첨단 이미징 기술을 접목시켜 초미세구조를 이미징하는 연구가 진행되고 있으며, 다른 한쪽에서는 질량분석기술을 이용하여 초미세구조를 이루는 새로운 구성 단백질들을 분리해내어 이를 밝혀내는데 초점을 맞추고 있다. 특별히 단백질체

질량분석기술(mass spectrometric proteomics)은 최근 20년간 혁신을 혁신을 거듭하면서 생물학 전반에 대단한 공헌을 미치고 있다. Orbitrap 경우, 사람 세포를 용균(lysis)시켜 얻은 용해물(lysate) 샘플을 트립신소화(trypsin digestion)하여서 얻게 되는 수만개의 펩타이드의 MS/MS패턴을 통해서, 사람 세포에 발현하는 것으로 알려진 10,000 개 이상의 주요 단백질들을 정확히 동정해낼 수 있는 민감도를 보이는 매우 훌륭한 성능을 보여주고 있다. 이런 상용화된 질량분석기기를 이용하면 샘플 내에 존재하는 매우 많은 단백질들을 상당한 수준의 민감도를 갖고 발견할 수 있는 상황이 된만큼, 단백질체학에 있어서 가장 중요한 이슈 중의 하나였던 ‘얼마나 많은’(how many) 단백질을 검출할 수 있는가 하는 문제는 이제는 ‘얼마나 정확한’(how specific) 단백질들의 정보를 알아내어 실제 생물학 연구에 올바른 정보를 전달할 수 있는가의 문제로 최근 확장되고 있다고 볼 수 있다.

현재 단백질체 연구는 질량분석기에 주입된 시료들에 존재하는 단백질들을 정확히 동정할 수 있는 수준까지 발전해왔으나, 문제는 질량분석기에 주입될 샘플이 이전 실험 과정에서 적합하게 준비가 되지 못할 때 발생하는 수많은 위양성(false positive)에 해당하는 단백질들까지도 같이 분석이 되어 결국 실험자에게 별로 유용하지 못한 분석결과를 얻게 되는 문제에 봉착해있는 경우가 많다. 예를들어 초미세구조를 이루는 세포소기관(cellular organelle) 이나 거대분자복합체(macromolecular complex)들에 존재하는 단백질들에 대해서 질량분석실험을 수행하기 위해서는

연구자가 원하는 세포소기관이나 거대분자복합체를 살아 있는 세포에서 정제해야하는 ‘분리’ 과정이 필요한데 보통 특정 세포소기관을 분리하기 위해서는 농도구배 고속원심 분리(gradient centrifugation) 과정을 거치면서 특정 세포소기관이 갖는 밀도에 해당하는 구획(fraction)을 분리해내어 특정 세포소기관을 분리해내는 과정이 일반적으로 수행된다. 문제는 오로지 밀도에 기반하여 분리된 구획은 거의 항상 다른 세포소기관에 의해서 오염되어있어 이 구획을 질량분석기에 주입할 경우, 실험자가 원하는 세포소기관에 해당하는 단백질체뿐만 아니라, 과정 중에 불가피하게 오염된 다른 세포소기관의 단백질체도 동시에 분석이 되어 결국 질량분석결과로 나온 단백질 리스트를 볼때 다른 세포소기관의 단백질체의 정보(false positive)가 혼재한 상태의 실험데이터가 되게되어 결국 생물학 커뮤니티에 특정 세포소기관에는 어떤 단백질들이 머무르고 있는지에 대한 정확한 정보를 전달할 수 없게 된다.

또한 막으로 둘러싸여있지 않은 공간에서 초미세구조를 이루는 거대분자복합체를 분리해낼 때 주로사용하는 면역침강법(co-immunoprecipitation(Co-IP)) 이라는 방법은 살아있는 세포의 세포막을 깨서 얻은 세포질을 대상으로, 거대분자복합체를 이루는 단백질중에 특정 항체(antibody)에 선택적으로 결합하는 단백질을 타겟으로 고정화되어있는 항체를 마치 낚시 바늘과 미끼(bait) 처럼 이용하여 세포질에서 분리해 낼때(pull-down) 연구자가 이미 알고 있는 특정단백질과 강한 결합을 이루는 단백질(unknown protein) 까지 같이 분리해내는 기술을 의미한다. 이렇게 분리된 단백질들을 질량분석기에 주입하면 거대분자복합체를 이루고 있는 특정 타겟 단백질에 붙어있는 단백질들의 정보를 바로 알 수 있게 되며, 실제로 많은 경우가 Co-IP 방법을 이용하여 의미있는 거대분자복합체를 이루는 단백질 구성원들을 알아내고 있다. 하지만 이 Co-IP 방법은 오직 강한 비공유 결합을 갖고 결합하는 단백질들만을 분리해낼 수 있을뿐, 약하거나 일시적인 비공유결합을 갖고 거대분자복합체를 이루는 단백질 구성원들은 분리해낼 수 없는 근본적인 한계점을 갖고 있다. 또한 Co-IP 의 과정이 살아있는 세포에서 이루어지는 것

이 아니라, 인위적인 조성을 지닌 추출액(lysis buffer)을 이용하여 살아있는 세포를 깨서 얻은 ‘죽은’ 세포질 용액에서 거대분자복합체의 분리가 시작되는 것이기 때문에, 살아있는 세포에서는 절대 일어날 수 없는 인공적인 단백질간의 결합(protein-protein interaction)이 lysis buffer 안에서 일어날 가능성이 항상 존재한다. 결국 시험관 속(in vitro)에서 Co-IP를 통해서 거대분자복합체를 분리해내었다 하더라도, 그 분자복합체가 과연 살아있는 세포 안(in vivo)에 존재하는 단백질 구성을 그대로 반영한다고 볼 수 없는 경우가 있으며 질량분석 결과 실제로 위양성에 해당하는 단백질들이 질량분석결과 나타난다는 문제점이 이미 Co-IP를 수행한 많은 연구자들 사이에서 제기되고 있다.

이렇듯 눈부시게 발전한 단백질 질량분석기술은 사실상 세포소기관 및 거대분자복합체 분리방법이 발맞추지 못하고 있지 못하기 때문에, 새로운 세포소기관 단백질체 방법이 필요하였으며, 최근 몇년간 기존의 단백질체 분리방법을 뛰어넘을 수 있는 확연히 다른 새로운 단백질체 분리방법이 효소화학반응을 이용하여 개발되었고 이를 이용한 놀라운 단백질체 맵핑(proteomic mapping) 결과들이 보고가 되고 있어 이에 관한 연구를 소개하고자 한다.

본론

1. 퍼옥시데이즈(Peroxidase)를 이용한 단백질체 맵핑 방법

퍼옥시데이즈(Peroxidase)는 헴(heme)기를 갖는 효소 단백질로서 과산화수소와 반응하게 되면 산화력이 강한 Compound I/II state를 갖추면서 페놀류 화합물의 전자를 빼앗아 페녹시 라디칼(phenoxy radical)을 생성해내는 것으로 잘 알려져있다. 현재 잘 알려지고 가장 많이 사용하는 퍼옥시데이즈로는 Horseradish peroxidase

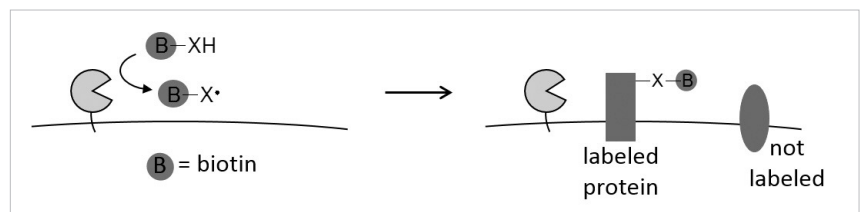


그림 1. 효소화학 반응을 이용한 주변 단백질체 레이블링 반응의 모식도

(HRP)이며 이는 서양고추냉이(Horseradish)에서 비롯된 효소이며 반응성이 굉장히 좋아 폴리머 합성에서는 이미 오래전부터 라디칼 생성촉매로 사용되어오고 있었고, 생물학 분야에서도 퍼옥시데이즈에서 생성해내는 페녹시 라디칼을 이용하여 주변단백질의 타이로신(tyrosine)기에 프로브를 다수 레이블링하여 얻어지는 강한 형광시그널을 의미짓는 tyramide signal amplification assay(TSA)라는 기법으로 활용되어오기도 하였다.

특별히 라디칼 물질은 수용액상에서 존재하는 지속시간(lifetime)이 수 밀리초(millisecond) 보다 짧기 때문에 퍼옥시데이즈에서 생성되는 라디칼은 반경 20nm이내의 단백질만을 레이블링할 수 있는 특이성을 갖게 된다. 이런 특성을 이용하여 일본의 Koichi Honke 교수연구팀에서는 세포의 막단백질중에서 beta-Integrin에 결합하는 다수의 receptor tyrosine kinases(RTK) 들을 항체(antibody)-HRP에서 생성해내는 바이오틴(biotin)이 달린 라디칼 물질을 이용하여 레이블링하였다. 이후 바이오틴이 달린 단백질들은 스트렙타비딘(Streptavidin) 단백질로 코팅된 비드에 의해서 분리되어 어떤 RTK 단백질이 바이오틴화(biotinylation)되었는지를 동정(identification)하여 2008년에 보고하였다.¹ 이렇게 바이오틴화된 단백질들 중에 새롭게 밝혀진 beta-Integrin와 interaction을 갖는 RTK들이 보고가 되었기 때문에 중요한 생물학적인 정보를 제공한다고 볼수 있다. 또한 이런 방법을 통해서 밝혀진 국소 단백질체 정보는 살아있는 세포에서 레이블링이 이루어진 것이기 때문에 기존의 Co-IP 등의 방법을 통해서 동정된 단백질체보다 더욱 정확한 정보를 담고 있다고 볼수 있다. 또한 이런 항체-HRP를 이용한 표지화(labeling) 방법은 최근에도 B 세포 수용체(Cell Receptor) 클러스터² 등의 다양한 막단백질클러스터(membrane protein cluster)를 동정해내는데 사용되고 있다.

항체-HRP는 세포의 막단백질 단백질체를 분석해내는데 유용하게 사용될 수 있지만 살아있는 세포내부로 유입은 힘들기 때문에, 세포내부의 다양한 단백질체 분석에는 적용될 수 없는 한계점이 있다. 이에 HRP 등의 퍼옥시데이즈 효소의 유전자(plasmid gene)를 세포에 도입하여 세포내부에서 발현시키는 방법을 생각할수 있는데 특별히 이런 유전자 도입방법(Genetically-Encoded Approach)

의 장점은 지금까지 세포생물학 연구로 축적되어온 매우 다양하고 정확한 시그널 시퀀스(signal sequence)를 퍼옥시데이즈 유전자에 앞뒤로 붙여주게 되면 해당 효소를 연구자가 원하는 세포내 소기관 및 세포내 소기관 세부공간에 정확히 타겟팅할 수 있는 장점이 있다. 하지만 HRP의 경우에는 단백질 구조에서 총 4개의 이황화결합을 갖고 존재하는데, 세포질이나 미토콘드리아 기질등의 환원 조건을 갖고 있는 세포내 공간에서는 발현 및 타겟팅은 되지만 퍼옥시데이즈 활성을 보이지 않는 단점을 지닌다. 그렇기 때문에 미국 MIT의 Alice Ting 교수연구팀에서는 세포의 어느 공간에 발현이 되어도 활성을 잃지 않는 APEX(engineered ascorbate peroxidase)를 이용하는 국소적인 단백질체 맵핑방법을 개발하였고 미토콘드리아 기질(2013)³ 미토콘드리아 이중막 공간(2014)⁴ 단백질체를 성공적으로 맵핑하였다. 이 방법이 성공적일 수 있었던 이유는 APX(ascorbate peroxidase)이 갖는 구조적 안정성때문인데, APX는 원래 식물의 세포질에 발현되는 퍼옥시데이즈이기 때문에 이황화결합을 갖지 않고 크기도 28kDa으로 형광단백질로 많이 사용되는 GFP(27kDa)와 비슷한 크기이다. 하지만 wild type의 APX(wtAPX)를 바로 단백질체 레이블링 실험에 쓰이는데에는 몇가지 극복되어야할 점이 있었는데 첫번째는 wtAPX가 갖는 이중체(dimeric) 성질이며 두번째는 wtAPX의 페녹시 라디칼 생성능력이 HRP에 비해 현저하게 떨어진다는 것이었다. 첫번째 dimeric 성질은 Tag 단백질이 갖기에는 부적합한 성질이기 때문에 APX의 결정구조에 입각하여 dimeric face에서 전하간 인력을 생성하는 두 아미노산 잔기를 척력이 작용하게끔 하는 돌연변이(mutation)(K14D, E112K)을 도입하므로 단위체(monomeric) APX(mAPX)로 엔지니어링할 수 있었고 여기에 헴(heme)기에 distal site에 위치하는 41번째 트립토판 잔기를 페닐알라닌등의 잔기로 바꾸었을때(W41F) 라디칼 생성능력이 크게 증가함을 통해 engineered APX(APEX)를 개발하였으며 최근에는 같은 연구실에서 효모디스플레이(yeast display)를 통해 A134P 돌연변이(mutation)가 헴(heme) 결합력을 더 증가시킴으로 활성을 더욱 증가시키는 APEX2도 보고하였다.⁵

이런 APEX의 활성은 세포의 핵, 세포질, 소포체 내부(ER lumen), 골지체, 세포막 등 어느 공간에 발현을 시켜

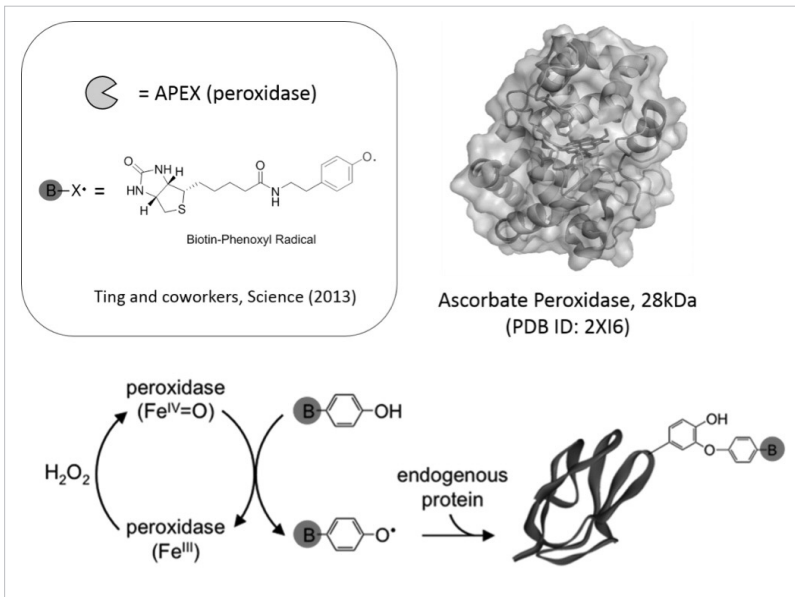


그림 2. 퍼옥시데이즈 효소 반응의 모식도 및 APX 효소의 구조

도 뛰어난 바이오틴-라디칼 생성을 통해 주변 단백질을 바이오틴화시키는 범용성이 있다. 하지만 이를 이용하여 첫 번째로 맵핑한 국소단백질체는 미토콘드리아 기질 단백질체였는데 그 이유로는 세포소기관 단백질체중에 제일 연구가 많이 이루어져온 단백질체가 미토콘드리아 단백질체⁶이기 때문에 APEX를 이용한 새로운 방법을 통해서 맵핑된 단백질체를 비교검증하여 본 방법이 얼마만큼의 특이성(specificity)를 지니는지를 확인할 수 있기 때문이다. 또한 지금까지 미토콘드리아 단백질체 연구가 주로 미토콘드리아 전체에 관한 단백질체 맵핑 연구였다면 본 연구는 미토콘드리아 기질이라는 미토콘드리아 세부공간에 관한 맵핑연구기 때문에 미토콘드리아 단백질체에 관해 더욱 세부적인 정보를 알 수 있게 된다.

미토콘드리아 기질에 타겟팅된 APEX(매트릭스-APEX)를 통해서 총 495개의 단백질들이 바이오틴화된 후 질량분석으로 동정되었으며 이중에 94%의 단백질이 기존의 미토콘드리아에 존재하는 단백질이었지만 지금까지 전혀 미토콘드리아와는 관련이 없다고 여겨진 31개의 단백질(6%)도 역시 같이 매트릭스(matrix)-APEX에 의해서 레이블링되어있는 것을 볼 수 있었다. 실제로 이 31개의 단백질들을 세포이미징해본 결과 대다수 확실한 미토콘드리아 패턴을 보이고 있으므로 본 연구에 의해서 새롭게 밝혀진 미토콘드리아 단백질로 확인되었으며, PPOX, Pnpase 등의 기존의 미토콘드리아의 이중막 사이의 공간에 존재하는 단백질로 알려진 몇 개의 단백질도 매트릭스-APEX에 의해 레

이블링 되었으며 이후의 전자현미경이미징 실험을 통해 모두 미토콘드리아 기질에 존재하는 것으로 밝혀질 수 있었다. 더 나아가 매트릭스-APEX에 의해 맵핑된 270개의 미토콘드리아 단백질들도 미토콘드리아 기질에 존재하는 것으로 미루어 짐작할 수 있게 된다.³ 이런 APEX 단백질체 맵핑기술은 여타 다른 세포소기관 단백질체 맵핑에 적용이 될 수 있으며, 최근까지 미토콘드리아 이중막 사이 공간 단백질체(2014)⁴, 섬모(Primary cilia) 단백질체(2015)⁷, ER-PM 간극분포 단백질체(2015)⁸ 등 기존의 분리기술로는 깔끔하게 분리해낼 수 없었던 세포소기관 및 거대분자복합체를 맵핑하는데 유용하게 사용되고 있으며 앞으로도 APEX로 맵핑되는 여러 국소단백질체들의 정보가 더 많아질 것으로 예상하고 있다.

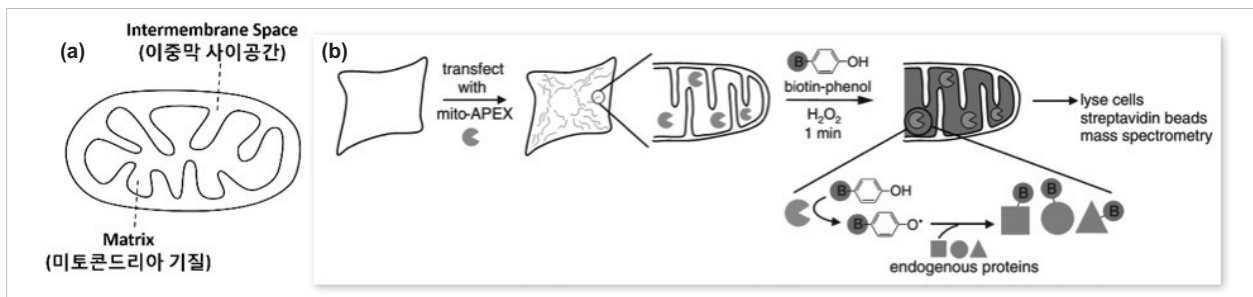


그림 3. 미토콘드리아 세부 공간구조 및 APEX를 이용한 미토콘드리아 기질 단백질체 맵핑의 모식도

2. pBirA 를 이용한 단백질체 맵핑방법

바이오틴 단백질 결합 효소(biotin ligase, BirA, 35kDa)는 대장균에 존재하는 효소로서 바이오틴과 ATP를 이용하여 activated ester에 해당하는 바이오틴-AMP 에스테르(ester) (와 PPI) 를 생성해내며 이 바이오틴-AMP 를 일명 AviTag (LNDIFEAQKIEWHE)이라고 불리는 펩타이드 시퀀스의 가운데 라이신(lysine) 잔기에 선택적인 아마이드 결합(amide coupling) 시켜주는 전사후 단백질 변형(post-translational protein modification)에 관여하는 효소이다.⁹ 그런데 이 BirA이 바이오틴-AMP를 생성했을때 이 바이오틴-AMP가 AviTag과 반응하기전에 용액(solution)으로 흘러나가지 못하게 막아주는 문지기(gate keeper)역할을 하는 R118 아미노산 잔기를 R118G로 돌연변이(mutation)하면 바이오틴(biotin)-AMP가 효소의 활성자리에서 흘러나가서 주변 단백질을 비특이적으로 레이블링(promiscuous labeling)할 수 있게 된다.¹⁰ 즉 AviTag을 갖지 않는 단백질이라도 이런 R118G BirA(=pBirA)의 근처에 존재하게 되면 pBirA가 생성해내는 바이오틴-AMP에 의해 바이오틴화될 수 있는 것이다. 이런 활성을 응용하여 미국 Sanford 연구소의 Kyle Roux 박사연구팀은 살아있는 사람배양세포에서 pBirA 를 살아있는 세포의 핵막에 발현시켜 핵막에 분포하고 있는 단백질을 바이오틴화 시킨 후 질량분석으로 동정한 연구결과를 2012년도에 발표하였다.¹¹ 또한 같은 그룹에서 핵공을 이루는 거대 분자복합체(nuclear pore complex)의 각기 다른 포지션에 pBirA를 발현시켰을때 서로 다른 핵공을 이루는 구성 성분을 바이오틴-표지화(biotin-labeling)하는 결과를 얻게됨에 따라 pBirA의 방법도 세포내에서 상당히 짧은 공간특이반응(spatial-resolved reaction)을 보여줌을 확인할 수 있었다.¹² 이런 pBirA를 이용한 국소 단백질 맵핑방법도 다른 연구자들에 의해 활용되어 최근까지 Centrosome(2014)¹³, ubiquitin E3 ligase substrate(2015)¹⁴, HIV-1 Gag interacting partner(2015)¹⁵, Toxoplasma inner membrane complex(2015)¹⁶ 등을 이루는 새로운 구

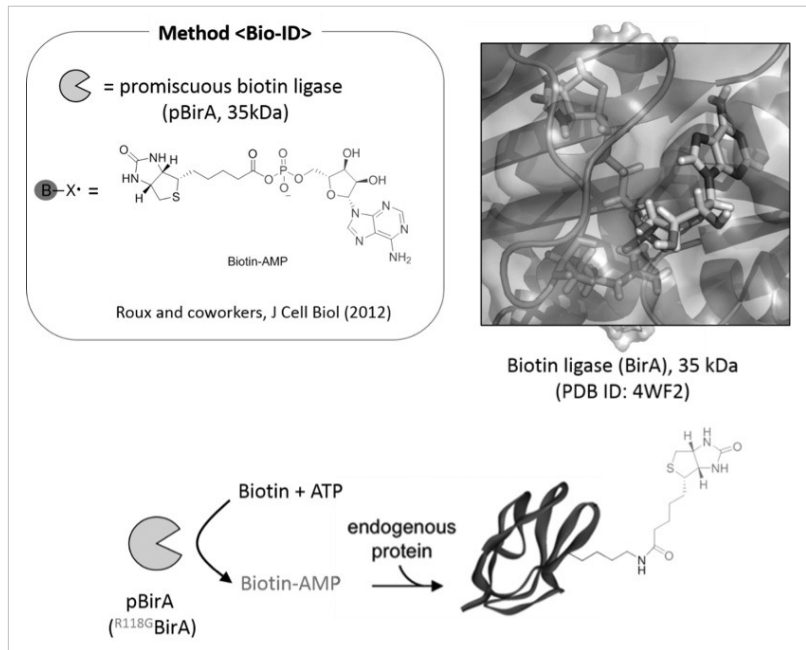


그림 4. pBirA의 구조와 pBirA를 이용한 단백질체 레이블링 반응의 모식도

성성분을 밝혀내고 있다.

3. APEX와 pBirA의 반응비교

흥미롭게도 APEX(2013)³ 와 pBirA(2012)¹¹ 를 이용한 단백질체 맵핑방법이 비슷한 시기에 각기 다른 그룹에서 제시가 되었고 현재까지 2~3년간 두 방법 모두 생물학적으로 유의미한 국소단백질체 맵핑결과를 내놓고 있기 때문에 어떤 방법이 더 우위에 있다고 평가하기는 힘들며 실제 실험에 있어서 각각의 방법의 장단점에 대해서 간단히 논하고자 한다. 반응 반경에 대해서 우선 논하자면 APEX의 경우에는 폐녹시 라디칼이 수용액상에서 존재하는 지속시간(lifetime)이 수 밀리초 보다 짧고 퍼옥시데이즈에서 생성되는 폐녹시 라디칼은 반경 20nm이내의 단백질만을 레이블링한다는 것은 Bendayan 교수의 전자현미경 실험(2001)¹⁷을 통해 잘 정립되어있다. 또한 실제 반응시키는 반응시간도 오직 과산화수소를 세포배지에 넣어주었을때만 바이오틴 폐녹시 라디칼 생성이 이루어지며 1분내에 주변 단백질과의 거의 모든 바이오틴 레이블링이 이루어지는 만큼 실제 반응수행시간도 매우 짧기 때문에 공간 뿐만이 아니라 시공간(spatiotemporal)에 따라 변하는 단백질체 맵핑을 가능하게 한다. 이에 비해 pBirA를 이용한 단백질

체 표지화 방법은 free 바이오틴을 배지에 넣어주고 12시간 이상 반응시간을 가져야지 어느 정도의 바이오틴 레이블링된 단백질들을 얻을 수 있게 된다. 이렇게 긴 표지시간 (labeling time)은 pBirA가 바이오틴-AMP를 생성하는데도 긴 시간이 걸리지만, 바이오틴-AMP 자체가 lysine(라이신)과 반응하는 시간도 수시간이상 소요되기 때문으로 추측한다. 특별히 12~24시간의 레이블링 시간은 포유동물 걸쳐 세포의 경우에는 한번 분열할 수 있는 시간이기 때문에 핵 등의 경우에는 핵막등이 와해되고 여러가지 단백질들과 뒤섞이는 과정중에서 바이오틴 레이블링이 될 수 있는 결과도 가져올 수 있다. 하지만 pBirA가 레이블링한 결과를 보면 공간특이적인 단백질들을 상당수 레이블링하는 것을 확인할 수 있는데 이는 세포안에서의 바이오틴-AMP의 국소농도가 pBirA 근처에서 가장 높을 것이기 때문에 이곳에 모여 존재하는 단백질들의 라이신 잔기 (lysine residue)들이 우선적으로 바이오틴화되기 때문으로 나타나는 것으로 해석할 수 있다.

pBirA의 큰 장점으로 꼽자면 과산화수소를 쓰지 않아도 반응을 시킬 수 있다는 것에 있으며 이는 거꾸로 APEX를 쓰는 방법의 가장 큰 단점이기도 하다. 과산화수소는 세포 생물학자들에게 세포사멸(apoptosis)을 일으키는 시그널로 잘 알려져있기 때문에 실제로 과산화수소를 처리하는 과정을 세포에게 굉장히 큰 스트레스로 다가올 수 있다. 하지만 APEX 반응을 하기 위해 쓰는 과산화수소는 1mM의 농도로 1분간 처리하고 이후에는 세포가 죽어도 사실상 상관이 없기 때문에 (어짜피 질량분석을 위해서 세포를 lysis해야하므로) 과산화수소를 처리하는 1분간 단백질체구성요소가 크게 영향을 받지 않는 경우라면 APEX를 사용해도 괜찮다고 볼 수 있다. 또한 pBirA의 실제 실험적인 장점으로는 프로브에 해당하는 물질이 바이오틴이고 비교적 값싸게 그램 단위로 구입할 수 있으므로 pBirA 만 있으면 쉽게 실험을 수행할 수 있는 장점이 있는 반면 APEX의 경우에는 바이오틴-페놀(biotin-phenol)을 따로 합성해서 써야 하는 번거로움이 있었다. 하지만 최근에 바이오틴-페놀도 상용화가 되어서 많은 실험실에서 APEX를 이용한 많은 단백질체 맵핑 활용을 기대해볼 수 있게 되었다.

또한 APEX의 경우에는 APEX가 달린 단백질을 세포에서 발현시키고 포르말데하이드 등으로 고정 (fixation)시

kinh Diaminobenzidine (DAB)/OsO₄ 등을 통해서 전자현미경 이미징할 수 있는 장점이 있다.^{5,18} 이는 APEX가 고정된 상황에서도 heme기에 의한 라디칼 생성능력이 보존됨에 따라 DAB 라디칼을 생성하고 오스뮴과 결합력이 있는 DAB 폴리머를 생성할 수 있기 때문이다. 이는 연구자가 자신이 만든 APEX가 달린 단백질이 세포내의 어떤 초미세공간에 타겟팅 되어있는지 전자현미경 레벨에서 정확히 알아해낼 수 있는 매우 유용한 정보를 제공한다. 어떤 단백질의 경우에는 APEX나 pBirA와 같은 Tag 단백질을 달아서 발현시키는 경우 원래 단백질의 이동(trafficking)에 영향을 받는 경우도 있기 때문에 연구자가 발현시킨 효소단백질이 어디에 분포하고 있는지 정확히 전자현미경 이미징하여 확인하는 실험은 앞으로의 맵핑 실험에서 비롯된 결과에도 큰 신뢰도를 줄 수 있게 된다. 이렇게 전자현미경으로 검증된 APEX construct는 프로브만 바이오틴-페놀로 바꾸면 주변 단백질체 맵핑에 바로 사용할 수 있기 때문에 연구자의 입장에서는 위양성을 발견하는 위험도를 줄이면서 타겟 단백질체에 보다 정확히 접근할 수 있는 장점이 있다.

마지막으로 pBirA는 주변 단백질의 라이신을 타겟으로 바이오틴화시킬 수 있으며 이것은 APEX 주변 단백질의 tyrosine(타이로신)기를 타겟으로 바이오틴화시키는 것에 비하면 장점이 될 수 있는데 이는 보통 단백질 표면에 라이신기가 타이로신기보다 더 많은 빈도로 노출되어있기 때문이다. 거꾸로 이야기하자면 APEX 표지화의 경우에는 주변에 단백질이 존재하여도 표면에 노출된 타이로신기가 없다면 표지화가 되지 않는 경우도 있을 수 있다. 하지만 두 방법 모두 효소 주변에 어떤 단백질이 근접하여 존재하여도 그 단백질이 다른 단백질 구성성분에 의해서 빈틈없이 둘러쌓여있게 된다면 단백질 복합체 안쪽에 위치하는 단백질은 pBirA이든지 APEX에 의해서 레이블링 될 수 없는 한계점이 존재한다. 달리 이야기하자면 pBirA 나 APEX를 이용하여 특정 단백질체를 맵핑을 했을 경우, 잘 알려진 단백질이 리스트에 존재하지 않아도 그 단백질이 구성성분이 아니라는 증거는 될 수 없다는 것이다. 즉 두방법을 통해서 맵핑된 단백질체 리스트에서는 어느 정도의 false negative가 존재하게 되는데 매트릭스-APEX를 써서 미토콘드리아 기질에 존재하는 것으로 잘 알려진 단백질체를 대

상으로 체크했을 때 약 80%의 단백질들은 재연성있게 레이블링되어 발견되는 반면, 20%의 단백질들은 한번도 레이블링되지 않는 결과를 얻게 되었다.³ 이 20%에 해당하는 단백질들은 발현정도도 낮지 않고 결정구조를 살펴본바 표면에 노출된 타이로신 잔기가 있음에도 불구하고 레이블링이 되지 않았기 때문에 미토콘드리아 기질내에서 다른 단백질에 의해서 복합체(complex)를 이루면서 복합체 내부에 존재하는 단백질로 추정할 수 있다.

결론

앞서 논의하였듯이 APEX와 pBirA는 서로의 장단점을 보완할 수 있는 특성을 지니고 있고 두 방법 모두 활발하게 현재 생물학자들에 의해 각자가 관심있는 단백질체 맵핑 연구에 이용되고 있다. 이런 일련의 연구들을 통해서 멀지 않은 미래에 상당히 구체적이고 정확한 단백질 분포의 세포 지도가 완성될 수 있을 것으로 생각한다. 그리고 많은 생물학자들이 관심있어하는 단백질간의 결합 파트너를 찾는 연구에도 APEX와 pBirA가 어느정도 활용될 수 있다.¹⁴ 하지만 이는 더 짧은 반응 반경을 갖는 반응물(reactive species)을 생성하는 효소화학반응이 개발된다면 더 효과적으로 상호작용체(interactome) 맵핑에 도움을 줄 것으로 전망한다. 또한 세포에는 단백질만이 고유의 자리를 갖으며 분포하는 것이 아니라 DNA나 RNA 등도 핵속과 세포질에 굉장히 특수한 공간에 분포하고 있다는 것이 속속히 알려짐에 따라 단백질이 아닌 다른 종류의 생체분자와도 반응할 수 있는 새로운 효소화학반응 시스템의 개발도 각각의 생체분자들이 세포안에서 어떻게 비대칭적인 분포를 보이는지를 밝혀낼 수 있는 중요한 도구가 될 것으로 내다본다. /

참고문헌

1. Kotani, N.; Gu, J.; Isaji, T.; Udaka, K.; Taniguchi, N.; Honke, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 7405.
2. Li, X. W.; Rees, J. S.; Xue, P.; Zhang, H.; Hamaia, S. W.; Sanderson, B.; Funk, P. E.; Farnedale, R. W.; Lilley, K. S.; Perrett, S.; Jackson, A. P. *The Journal of biological chemistry* **2014**, *289*, 14434.
3. Rhee, H. W.; Zou, P.; Udeshi, N. D.; Martell, J. D.; Mootha, V. K.; Carr, S. A.; Ting, A. Y. *Science* **2013**, *339*, 1328.

4. Hung, V.; Zou, P.; Rhee, H. W.; Udeshi, N. D.; Cracan, V.; Svinikina, T.; Carr, S. A.; Mootha, V. K.; Ting, A. Y. *Mol Cell* **2014**, *55*, 332.
5. Lam, S. S.; Martell, J. D.; Kamer, K. J.; Deerinck, T. J.; Ellisman, M. H.; Mootha, V. K.; Ting, A. Y. *Nature methods* **2015**, *12*, 51.
6. Pagliarini, D. J.; Calvo, S. E.; Chang, B.; Sheth, S. A.; Vafai, S. B.; Ong, S. E.; Walford, G. A.; Sugiana, C.; Boneh, A.; Chen, W. K.; Hill, D. E.; Vidal, M.; Evans, J. G.; Thorburn, D. R.; Carr, S. A.; Mootha, V. K. *Cell* **2008**, *134*, 112.
7. Mick, D. U.; Rodrigues, R. B.; Leib, R. D.; Adams, C. M.; Chien, A. S.; Gygi, S. P.; Nachury, M. V. *Developmental cell* **2015**, *35*, 497.
8. Jing, J.; He, L.; Sun, A.; Quintana, A.; Ding, Y.; Ma, G.; Tan, P.; Liang, X.; Zheng, X.; Chen, L.; Shi, X.; Zhang, S. L.; Zhong, L.; Huang, Y.; Dong, M. Q.; Walker, C. L.; Hogan, P. G.; Wang, Y.; Zhou, Y. *Nat Cell Biol* **2015**, *17*, 1339.
9. Chen, I.; Howarth, M.; Lin, W.; Ting, A. Y. *Nature methods* **2005**, *2*, 99.
10. Choi-Rhee, E.; Schulman, H.; Cronan, J. E. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2004**, *13*, 3043.
11. Roux, K. J.; Kim, D. I.; Raida, M.; Burke, B. *The Journal of cell biology* **2012**, *196*, 801.
12. Kim, D. I.; Birendra, K. C.; Zhu, W.; Motamedchaboki, K.; Doye, V.; Roux, K. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, E2453.
13. Firat-Karalar, E. N.; Rauniyar, N.; Yates, J. R., 3rd; Stearns, T. *Current biology : CB* **2014**, *24*, 664.
14. Coyaoud, E.; Mis, M.; Laurent, E. M.; Dunham, W. H.; Couzens, A. L.; Robitaille, M.; Gingras, A. C.; Angers, S.; Raught, B. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2015**, *14*, 1781.
15. Ritchie, C.; Cylinder, I.; Platt, E. J.; Barklis, E. *Journal of virology* **2015**, *89*, 3988.
16. Chen, A. L.; Kim, E. W.; Toh, J. Y.; Vashisht, A. A.; Rashoff, A. Q.; Van, C.; Huang, A. S.; Moon, A. S.; Bell, H. N.; Bentolila, L. A.; Wohlschlegel, J. A.; Bradley, P. J. *mBio* **2015**, *6*, e02357.
17. Bendayan, M. *Science* **2001**, *291*, 1363.
18. Martell, J. D.; Deerinck, T. J.; Sancak, Y.; Poulos, T. L.; Mootha, V. K.; Sosinsky, G. E.; Ellisman, M. H.; Ting, A. Y. *Nature biotechnology* **2012**, *30*, 1143.

이현우 Hyun-Woo Rhee



- 서울대학교 자연과학대학 생명과학부, 학사 (2000-2004)
- 서울대학교 자연과학대학 화학부, 학사 (2000-2004)
- 서울대학교 자연과학대학 화학부, 박사 (2004-2009, 지도교수: 홍종인)
- 서울대학교 화학부, 박사후연구원 (2009-2010, 지도교수: 홍종인)
- Massachusetts Institute of Technology 화학과, 박사후연구원 (2010-2012, 지도교수: Alice Ting)
- UNIST 자연과학부 화학과, 조교수 (2013-현재)