

<Review Paper>

## 프로테오믹스를 이용한 내분비계 교란물질 환경독성 연구

김 호 승 · 계 명 찬\*

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

## Proteome in Toxicological Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

Ho Seung Kim and Myung Chan Gye\*

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

It is important to understand the potential human health implications of exposure to environmental chemicals that may act as hormonally active agents. It is necessary to have an understanding of how pharmaceutical and personal care products and other chemicals affect the ecosystem of our planet as well as human health. Endocrine disruption is defined as the ability of a chemical contaminating the workplace or the environment to interfere with homeostasis, development, reproduction, and/or behavior in a living organism or it's offspring. Certain classes of environmentally persistent chemicals such as polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins, furans, and some pesticides can adversely effect the endocrine systems of aquatic life and terrestrial wildlife. Research continues to support the theory of endocrine disruption. However, endocrine disruption 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 (2D/E) and MALDI-TOF mass spectrometry (MS) or protein chip array and SELDI-TOF MS. Proteomics have an opportunity to play an important role in resolving the question of what role endocrine disruptors play in initiating human disease. Proteomics can also play an important role in the evaluation of the risk assessment and use of risk management and risk communication tools required to address public health concerns related to actions of endocrine disruptors. Understanding the need for the proteomics and possessing knowledge of the developing biomakers used to assess endocrine activity potential will be essential components relevant to the topic of endocrine disruptors.

**Key words :** endocrine disrupting chemicals, proteome

### 서 론

본 연구는 한국학술진흥재단 연구비 (KRF-2002-005-C00022) 지원으로 수행되었음.

\* Corresponding author: Myung Chan Gye, Tel. 02-2290-0958, Fax. 02-2298-9646, E-mail. mcgye@hanyang.ac.kr

환경오염의 심각성과 국내외적으로 고조되는 환경에 대한 관심의 증대와 함께 인체에 해를 끼치는 환경독성

물질을 규명하고, 그 위험요인으로부터 방어를 위한 많은 노력들이 기울여지고 있다. 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemicals, EDCs)은 인류가 직면한 3대 환경문제 가운데 하나이며 국내에서도 많은 사회적 반향을 일으키고 있는 중요한 환경요인이다. EDCs는 일본 학자들이 화학물질이 환경으로 방출돼 마치 호르몬처럼 작용하는 물질이라는 뜻에서 환경호르몬으로 보편화됐다(Osteen and Sierra-Rivera 1997; Zacharewski 1998; Kavlock 1999). 내분비교란물질 중 대부분은 환경성 호르몬을 일컬으며 약물성 또는 자연성 호르몬으로서의 중요도는 미미하다. 미국 환경보호부(EPA)는 내분비교란물질을 “항상성(homeostasis)의 유지와 발달과정의 조절을 담당하는 체내의 자연호르몬의 생산, 방출, 대사, 이동, 결합, 작용, 혹은 배설을 간섭하는 체외물질”로 정의했다. 내분비계는 생명체의 거의 모든 생리기능에 관여하는 가장 중요한 조절시스템의 하나로 내분비계장애물질이 생체를 공격하는 부위는 거의 무차별적이다(Safe 2000; Nilsson 2000; Hutchinson *et al.* 2000; Kimmel and Markis 2001). 1990년대 들어 내분비계장애물질이 생식기능과 면역기능을 약화시키고, 행동 이상을 일으키며, 암 발생률을 높인다는 사실이 밝혀지기 시작했다(Nebert *et al.* 1991; Okey *et al.* 1994; Andersen *et al.* 1995; Olea *et al.* 1998; Goldman *et al.* 2000; Hoyer 2001; Spearow and Barkley 2001; Mori 2001; Oberdorster and Cheek 2001). 이제까지 내분비계 장애물질의 위해성을 평가하기 위해 해부조직학적, 분자생물학적, 면역학적 접근이 환경분야 연구에 응용되어 다양하게 시도되어왔으나 프로테오믹스(proteomics) 연구를 내분비계 장애물질 연구에 접목시키려는 시도는 아직까지 빈약하다. 내분비계 장애물질의 위해성 평가 연구에 있어서 생체 내에서의 기작과 약전을 위해 새로운 biomarker 또는 target protein을 찾아내어 내분비계 장애물질에 의한 영향 여부를 평가하는 것이 진단과 대처에 우선하며, 이를 위해서는 내분비계 장애물질에 의한 생체 내 반응변화에 관여하는 표적단백질의 탐색 및 특성 규명에 관한 연구를 필요로 한다. 현재 내분비계장애물질의 오염과 위해성 여부를 판정할 수 있는 표적단백질 개발을 위한 프로테오믹스 연구는 초유의 관심사이다. 이러한 연구에 있어서 다양하고 광범위한 시료분석과 체계적인 접근방법이 요구되고 있다. 이 총설에서는 내분비계장애물질과 프로테오믹스에 관한 개략적인 설명과 더불어 내분비계장애물질 연구에 프로테오믹스의 적용 가능성에 중점을 두고자한다.

## 내분비계장애물질

### 1. 개요

내분비계 교란물질이란 독성이 있는 유해화학물질 중에서 생체의 호르몬 분비 기능에 변화를 일으키는 물질로서, 생체는 물론 그 자손의 건강에도 변화를 가져올 수 있는 외인성 물질이다. 내분비계장애물질 또는 환경호르몬에 의한 생식기능 특히 남성생식기능의 교란현상이 전세계적으로 확인되고 대중매체를 통해 소개되어 사람들을 공황으로 몰고 갔으며 지금도 충격은 사라지지 않고 있다(Colborn *et al.* 1996). 특히 성호르몬의 기능에 영향을 많이 주기 때문에 생체의 건강뿐만 아니라 생식능력을 감소시켜 생물군의 개체 수까지도 줄일 수 있다. 내분비 교란물질들은 기존의 독성화학물질들보다 훨씬 저농도에서도 생체에 영향을 미칠 수 있으며, 먹이사슬을 통해 농축되기 때문에 더욱 위험하다. 이들은 대부분 지방친화성이 있어 생체내의 지방내에 주로 축적된다. 대표적인 반응기작으로 이들이 세포의 호르몬수용체(hormone receptor)와 결합하여 호르몬과 같은 작용을 하거나 정상적인 호르몬이 수용체에 결합하는 것을 막는 것 등이 널리 알려져 있다. 내분비계장애물질의 종류는 광범위하다(Lathers 2002). 1990년대 들어 본격적으로 내분비계장애물질의 위해성을 지적하기 시작한 세계야생보호기금(WWF)은 자연에 노출된 내분비계장애물질의 종류를 67종으로 선정했다(일본의 경우는 134종). 이를 크게 농약류(43종)와 합성화합물류(24종) 두 종류로 구분할 수 있다. 농약류는 대부분 자연계에 오랫동안 잔류하는 특성을 가진 염소(CI)를 포함한다. 보통 반감기가 2~12년인데, 최대 59년에 이르는 것도 있다. 대표적인 사례는 아트라진 농약인 DDT, 알드린, 이드린, 클로르단과 같은 농약 등이며 지금은 사용이 금지됐다(Turusov *et al.* 2002). 한편 합성화합물류는 농약류를 제외하고 각종 산업계에서 파생하는 유해화학물질을 일컫는다. 예를 들어 다이옥신(2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)은 제초제를 만들 때 부산물로 발생하거나, 소각장에서 피복전선이나 페인트처럼 유기염소계 화합물을 태울때 생성되는 대표적인 내분비계장애물질이다(Belinsky and Jaiswal 1993; Kleman and Gustafsson 1996; Nebert and Duffy 1997; Gonzalez and Fernandez-Salguero 1998; Nebert *et al.* 2000; Dragan and Schrenk 2000; Barouki and Morel 2001; Ma 2001; Andersen 2002; Tian *et al.* 2002). 폴리염화비닐(PCB)은 주로 산업 폐수에서 많이 검출되며(Anderson *et al.* 1991; Brown *et*

al. 1994; Reijnders 1994; Walker 1998), 이외에도 계면활성제로 사용되는 페놀류나 선박의 도료로 사용되는 트리부틸주석 (TBT), 합성수지 원료, 식품과 음료용 캔의 안쪽 코팅에 쓰이는 비스페놀A, 플라스틱 식기에 쓰이는 폴리카보네이트, 플라스틱 가소제인 프탈산화합물 (DOP, DBP, BBP), 컵라면 용기를 비롯한 각종 식품 용기에 사용되는 스티렌 다이머, 스티렌 트리머 등이 있다. 그러나 이들은 현재까지 알려진 화학물질 중에서 선택된 것일 뿐이며, 매년 수 십 만종 이상의 화학물질이 실험실에서 합성되고 있기 때문에 자연계에 얼마나 많은 수의 내분비계장애물질이 존재하는지는 예측하기 힘들다. 한편 유기용제는 용해력과 탈지세정력이 높아 화학제품 제조업, 도장관련산업, 전자산업 등 여러 업종에서 광범위하게 용제로 사용되며 일반적으로 비점이 낮고 휘발성이며 가연성 물질이 많다. 이들 유기용제는 비점에 따라 휘발성과 비휘발성으로 구분되어 비점이 20 °C 이하인 물질은 휘발성으로 분류되고, 활성기에 따라 할로겐족 또는 비할로겐족 화학물질로 분류된다 (Whaley et al. 2001). 특히 이들 중 수요가 많고 환경오염 측면에서 중요한 것은 유기염소계 용제로서 대표적 물질로는 트리클로로에탄, 트리클로로에틸렌 및 테트라클로로에틸렌이 있다. 이들은 다른 유기용제보다 값이 저렴하고 용해력과 세정력이 우수하며 친유성이며 반응성이 낮고 물리·화학적 특성이 매우 다양하며 인화성이 없으므로, 석유계 용제를 대체하여 반도체나 자동차 또는 섬유공업의 세정제로부터 잉크, 도료 및 접착제 등의 일반용제나 화학공업의 추출용제 등으로 널리 이용되고 있다. 살충제, 세척제 및 무기오염물질들이 생태계에 미치는 영향, 생물체의 축적, 침전물에 의한 흡착 및 거동 등이 비교적 잘 알려져 있다. 자연적인 환경조건에 따라 각 휘발성 유기물질의 지속력이 다른데, 예를 들어 1,2-dichloroethane은 대기 중에서 10~190일 정도의 반감기를 가지며, 토양에서는 수개월의 반감기를 갖는다. 수중에서는 휘발되기 때문에 비교적 짧은 반감기를 가지게 되나, 지하수의 경우는 휘발이 거의 일어나지 않기 때문에 그 잔류기간이 매우 길다.

## 2. 내분비계장애물질 위해성 평가연구

EDC의 위해성에 관한 연구는 독성학적 접근을 통해 잠정적 위험을 내포하는 물질을 찾고 그 위험의 강도 규명하고 생산 및 사용의 허용기준을 마련하는 한편 환경내 EDC의 오염실태 및 생태계에서 생식교란 현상을 규명하기 위한 연구가 진행되었다 (DeRosa et al. 1998; Gray 1998). 내분비계장애물질의 메커니즘을 정확히 밝

혀낸 설명은 거의 없다. 이런 상황에서 생체내의 내분비계장애물질의 직접검출과 내분비계장애물질에 의해 유발된 생체변화측정은 내분비계장애물질의 메커니즘을 밝히는데 필수 불가결한 연구가 될 것이다. 현재, 가장 많이 연구된 직접검출은 내분비계장애물질의 농도와 분포를 나타내지만 독성메커니즘을 밝히는데 큰 역할을 하지 못한다 (Hendry et al. 2002). Dioxin과 PCB에 의한 biomaker 연구는 heat shock protein과 arylhydrocarbon receptor (AhR)에 대한 연구 (Perdew 1988), cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenases에 대한 연구 (Kanetoshi 1992), glutathione S-transferase P-form (Aoki et al. 1992), UDP-glucuronosyltransferases (Oesch et al. 1992), UDP-glucuronosyltransferase isoforms (Clarke et al. 1992) 등에 대한 항체를 이용한 초기 연구들이 있고 나머지 대부분은 cytochrome P-450 (aryl hydrocarbon hydroxylase) 활성측정에 관련된 biomaker에 대한 immunoassay를 이용한 연구들이 진행되고 있다 (Thomas et al. 1983; Voorman and Aust 1987; Rifkind et al. 1994; De Jongh et al. 1995; Schulz et al. 1996; Reiners et al. 1997; Korytko et al. 1999; Smeets et al. 1999; Stegeman et al. 2001). 생체 내에서의 기작과 약전을 위해 우선 새로운 biomarker를 찾아내어 검출뿐만 아니라 생체 내 반응변화를 알아내고 표적단백질의 탐색 및 특성규명에 관한 연구와 단백질 probe의 제조, 평가, 개발을 위해 면밀한 생체 내 반응변화 연구가 우선한다. 한국은 빠른 속도로 공업화가 진행되는 과정에서 광범위하게 EDC를 포함한 공해물질로 오염되었다. 현재도 플라스틱제조과정, 쓰레기소각장, 하수종말처리장 등에서 bisphenol A, dioxin, octylphenol 및 nonylphenol 등의 내분비계장애물질이 다량으로 방출되고 있으므로 이에 따른 생태계의 변화는 필연적 현상이다. 이미 많은 종류의 야생 척추동물들이 서식지의 감소와 오염으로 인해 그 수가 줄어들었으며 멸종위기에 처한 동물들도 많으며 EDC는 이러한 현상의 보이지 않는 원인으로 추측된다 (Blaustein et al. 1994; Stebbin and Cohen 1995; Guillette 2000).

## 3. 내분비계장애물질의 검출기술

현재까지의 오염물질의 검사에는 고가의 분석기기 (GC/MASS, NMR 등)를 사용하여 고비용의 장시간을 요하는 검사방법이 주로 사용되어 왔다. 고비용의 단점을 극복하기 위하여 다수의 검체를 단시간에 검출할 수 있는 항원항체 반응을 이용한 immunoassay 방법이 개발되어 이용되고 있다. 그러나 다양한 난분해성 물질로 오염

**Table 1.** Biomarker used for detection of toxic compound

Biomarker	Target chemicals	Specimens	Mechanism
Benzene	Benzene	Blood	Expired benzene
S-Phenylmercapturic acid/ Trans-Trans-muicoic acid	Benzene, Phenol	Urine	Metabolites
Porphyrin	Hexachlorobenzene, PCBs, TCDD, TCDF	Urine, blood, liver	Oxidized Byproducts
Auto-antibody	TCE	Blood	Metabolites
S-Benzyl-N-acetylcysteine	Toluene	Urine	Metabolites
Hippuric acid	Toluene	Urine	Metabolites
S-p-Toluylmercapturic acid	Toluene	Urine	Metabolites
T-cell Ag-binding molecules	Toluene	Blood	
hprt/GPA/P53 gene	Toxic materials	Blood	Gene mutation
CYP2E1/CYP1A1	Benzene, Touene, Styrene, BTEX	Breath	Gene mutation
CYP2E1/Cytochrome oxidoreductase	TCE	Poplar extract	Phytoremediation

된 생체에 대한 오염량의 측정은 일반적으로 biomarker에 의하여 측정되는데 동물 또는 인체의 세포, 조직 또는 체액을 시료를 대상으로 생화학적, 유전학적, 면역학적 변화를 검출할 수 있는 표지자(biomarker)를 선택한다(Table 1). 제초제와 같은 난분해성 오염물질에 의한 생체변화를 규명하기 위해 혈액의 cholinesterase inhibitor활성, aryl hydrocarbon hydroxylase 활성을 반영하는 cytochrome P-450발현, hexachlorobenzene, PCBs, TCDD, TCDF에 의한 혈액 및 뇨중 porphyrin 농도, hemoglobin 합성에 관여하는 aminolevulinic acid dihydratase활성, PCBs, TCDD에 의한 retinol 감소, free radical 생성, 유전자 변형을 추적하기 위한 DNA damage 등이 biomarker로 이용되고 있다(Nebert *et al.* 1991; Belinsky and Jaiswal 1993; Okey *et al.* 1994; Andersen *et al.* 1995; De Matteis and Marks 1996; Kleman and Gustafsson 1996; Nebert and Duffy 1997; Gonzalez and Fernandez-Salguero 1998; Nebert *et al.* 2000; Dragan and Schrenk 2000; Barouki and Morel 2001; Ma 2001; Andersen 2002; Tian *et al.* 2002). 이와 같은 유해물질의 검출방법은 대부분 특이도와 민감도가 낮고, 단일 marker를 대상으로 하고 있기 때문에 다양한 환경 유해물질에 대한 종합적인 판단이 불가능한 상태이다. 또한 다른 질병 표지자와의 연관성이 높아 직접적인 유해물질 노출 위험도를 판정하기가 어렵다. 따라서 임상적으로 특이성이 높은 신규 진단 biomarker와 아울러 이를 검출할 수 있는 단일클론항체를 개발할 경우, 다양한 난분해성 오염물질을 직접 검출하거나 체내 축적정도 및 위해성을 진단할 수 있는 여러 형태의 키트개발을 도모할 수 있다. 따라서 기존의 biomarker보다 높은 신뢰도를 갖는 신규 biomarker를 탐색하고 이를 높은 민감도로 검출해 낼 수 있는 probe의 개발이 절실하다. 이와 관련하여

immunoassay법이 환경분야에 응용되면서 다양한 방법이 개발되었고, 간편하고 정확도가 높으며 저비용의 현장형 측정키트가 개발되었다(Dobashi 1999; Nielsen 2000; Takeuchi and Tsutsumi 2002). 이러한 방법들은 미국 환경보호청(EPA)의 공인검사법으로 이용되어 작업환경 및 생활환경, 공산품, 식품 분야의 검사에 응용되고 있다. 일반적으로 비생물 의학분야의 진단시장이인 환경, 식품 및 농축산 분야에서 화학물질 및 다른 오염물질을 검출하는데 사용되는 진단시약이 있다. 분석화학, 미생물학, 생화학 등의 고전적인 방법에 비하여 immunoassay를 비롯한 핵산테스트 및 biosensor 등 생물공학에 기초한 방법들은 단시간에 진단이 가능할 뿐 아니라 간편하며 운반이 쉽고 저비용의 장점 때문에 전통적인 시험법의 대안으로 사용되고 있다. 수백 종의 다양한 난분해성 물질들을 짧은 시간에 검사하여 높은 정확도의 측정자료를 얻기 위해서는 단일클론항체를 이용한 특이적 항원항체 반응을 검출하는 ELISA, antibody coated tube test, lateral-flow test, potable biosensor 등이 immunoassay법이 다양하게 이용될 수 있다. 보다 높은 특이도와 민감도를 나타내는 ELISA 항체의 개발은 다양한 난분해성 오염물질 검출 스펙트럼을 갖는 단백질칩 개발에 필수적인 기술이다(Harper *et al.* 1994; Johnson *et al.* 2000; Zajicek *et al.* 2000; Laschi and Mascini 2002; Sugawara *et al.* 2002).

## 프로테오믹스 (Proteomics)

### 1. 개요

현재까지 알려진 난분해성 오염물질의 인체 내 동태 연구로는 특정 물질의 인체 내 작용 메커니즘 분석과

immunohistochemistry로 biomarker를 탐색한 것들이 있지만, 내분비계장애물질에 의해 유발된 생체변화에 프로테오믹스를 이용한 연구는 절대적으로 부족하며 생물공학이나 의학학 등에 비해 거의 비교할 수 없을 만큼 빈약하다. 환경학에 프로테오믹스(proteomics)를 접목하려는 시도는 태동기라 할 수 있으며, target protein 또는 probe를 찾는 일이 가장 핵심적 연구가 될 것이다. 우선 프로테오믹스가 무엇인지 알아보기로 한다. 현재 인간의 게놈구조가 완전히 밝혀짐에 따라 인간유전자의 기능을 본격적으로 연구할 수 있는 이른바 포스트게놈시대가 시작되었다. 그러나 염기서열이 알려졌다고 해도 이들의 기능을 알아야만 의미가 있으므로 이런 유전자의 기능을 밝히는 총체적인 연구분야를 유전체기능분석학(functional genomics)으로 정의한다. 여기에는 기술적으로 DNA나 RNA를 시료로 사용하여 수행하는 유전체학(genomics), 단백질을 대상으로 연구하여 유전자기능을 연구하는 단백질체학(proteomics), 그리고 이 두 분야를 지원하는 생물정보학(bioinformatics)으로 각각 구분된다. 프로테옴(proteome)이란 게놈(genome)의 상대어로서(PROTEin expressed by a genOME)의 합성어이다. 프로테오믹스는 프로테옴(proteome)의 어미에 -ics가 붙어 프로테옴을 연구하는 방법과 기술을 포괄적으로 의미하는 말이다. 즉, 단백질의 성질을 발현, 번역 후 변형(post-translational modification), 다른 단백질과의 결합에 초점을 두어 연구하여, 세포 내 변형과정과 네트워크 형성을 질병의 진행과정과 연계시켜 총괄적으로 이해할 수 있는 연구분야를 뜻한다(James 1997).

2. 지노믹스와 프로테오믹스

유전체기능분석학의 핵심은 DNA 수준에서 주로 유전

자의 발현양상을 분석하는 것으로 대표적인 예로는 DNA microarray technology가 있다. 그러나 문제는 유전체학의 핵심적 연구대상인 인간 유전체 염기서열이 밝혀졌음에도 불구하고 염기서열만으로 이 유전자 산물의 기능을 완전히 이해할 수 없다는 점이다. 유전자가 전사되어 단백질 생성(translation)까지 되었다 하더라도 최종적으로 세포 내에서의 기능여부는 얼마나 정교하게, 적절하게 단백질합성 후 변형되는가에 달려 있으므로 최종적으로 완벽한 구조가 갖추어진 단백질을 분석하지 않고는 대상 유전자의 세포 내 기능을 알 방법이 없다. 특히, 한 유전자의 mRNA가 만드는 단백질의 실제 기능적인 모습은 세포, 조직, 시간, 조절인자에 따라 여러 모습으로 변하기 때문에 이것을 생리적 변화에 따라 분석하는 tool과 system이 필요하다. 이것을 해결할 수 있는 곳이 프로테오믹스 영역이다. 지노믹스는 분석의 효능적 측면에서 핵산 간의 결합반응 과정에서 나타나는 위양성반응의 문제점 등으로 인해 결과로 얻어진 발현 정보를 유전자 개별로 확정할 수 없는 난점을 가지므로 결과의 해석에 유의하여야 할 뿐 아니라 얻어진 정보의 확정을 위해 재차 염기서열 분석을 시행하여야 하므로 경제적 부담이 가중된다. 그러나 새로운 유전자 및 유전자간의 상호관계를 분석하는데는 여전히 강력한 수단이다. 한편 프로테오믹스의 경우 지노믹스와 마찬가지로 경제성, 분석의 효능성적 측면에서 제한사항이 존재할 뿐 아니라 미량으로 발현되는 단백질의 경우 분석이 곤란한 점과 현재로서는 미진한 수준인 단백질 database 구축으로 인해 생물정보학의 도움을 크게 받지 못한다. 그러나 기능 발현에 필요한 단백질의 최종적 상태를 분석의 대상으로 한다는 점에서 커다란 장점을 갖는다(Table 2). 이 기술의 발전은 대량발굴탐색(high-throughput screening)이 가능한 2-dimensional gel

Table 2. Genomics and proteomics in toxicology

Uses	Limitations
<p><b>Genomics and gene expression arrays</b></p> <p>Simultaneous analysis of thousands of genes</p> <p>Efficacy for toxicity screening</p> <p>Customized arrays of specific genes or gene families</p> <p>Discovery of novel genes or gene relationships</p>	<p>Cost</p> <p>Does not identify post-transcriptional changes</p> <p>Unknown false-positive and false-negative rate</p> <p>All clones must be periodically sequence-verified</p> <p>Effective data interpretation</p>
<p><b>Proteomics</b></p> <p>Simultaneous analysis of thousands of proteins</p> <p>Efficacy for toxicity screening</p> <p>Identification of posttranslational modifications</p> <p>Discovery of novel proteins or roles in toxicity</p>	<p>Cost</p> <p>Unknown false-positive and false-negative rate</p> <p>Miss low abundance proteins</p> <p>Bioinformatics for proteins in infancy; software and systems need to screen, identify, and select most interesting proteins</p>

electrophoresis (2D/E)와 MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight) 또는 protein chip array와 SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption ionization time of flight)에 의한 단백질 분자 구조 분석 기술 및 이들을 지원하는 생물정보학(Bioinformatics)의 발전과 연결되어 있다(Berndt *et al.* 1999; Blackstock and Weir 1999). 따라서, 프로테오믹스는 세포의 생리적 상태변화에 따른 분자적인 현상과 세부적인 기전을 발굴할 뿐만 아니라 어떻게 단백질의 표현형(phenotype)이 질병과 약물 처리에 따라 변화하는지 분석할 수 있고, 이로 인해 약물표적의 식별과 검증에 할 수 있게 된다. 실제로 프로테오믹스가 약물표적 발굴에서도 가장 강력한 기술인 이유는 단백질만이 실제로 약물의 mode-of action의 최종 장소이고, 유전자 발현에서 보이는 효과들은 단순히 단백질수준에서 내는 약물효과에 대한 반응에 지나지 않으며, 유전자 발현과 단백질 발현간에는 직접적인 관련성이 항상 있는 것은 아니기 때문에 유전자와 이것의 기능간의 교량역할을 할 수 있는 단백질의 역할을 분석하는 것이 중요하며, 단백질-단백질간의 결합이 세포 내 생물학적 작용의 최종적인 행위가 되기 때문이다.

### 3. 단백질 분석기술

프로테오믹스의 시작점인 단백질 생화학은 한때 많은 시간이 소비되는 어려운 일로 인식되어 왔고, 2D/E가 매우 정교한 단백질 분리기술인데도 불구하고 분석 이외에 분리정제를 목적으로 사용되지 않은 탓에 현재의 프로테오믹스처럼 큰 역할을 하지 못했다. 단백질의 화학적인 분자량 측정에는 다른 작은 생체분자들처럼 MALDI와 분무이온화법(ESI, electron spray ionization)이 이용된다. MALDI 분석에는 분석대상물질의 비행시간을 측정하여 질량( $m/z$ )을 분석하는 TOF형(MALDI-TOF)이 활용되고, ESI법(Nguyen *et al.* 1995; Apffel *et al.* 1998; Papac and Shahrokh 2001)은 정제된 시료를 이온화시켜 분석하는 방법으로 크로마토그래피와 결합하여 사용할 수 있다. 프로테오믹스는 2D/E가 preparative 용도로 사용하기 시작하고 고정화된 pH gradient 기술이 접목되면서 매우 빠르게 발전하였다. 이와 더불어 2D/E용 sample 추출방법과 컴퓨터를 이용한 고도로 정밀한 2D/E gel image 분석법이 개발되면서 빠르게 발전하였다. 즉, pH 등전점(pI)으로 나타내는 단백질의 net charge에 따라 시료 내의 단백질을 제1차 분리한 후(1D/E), 분자량에 따라 분리하는(2D/E) 방법이다. 이 기술을 사용하면 생체시료의 특정 생리조건에 따라 분석

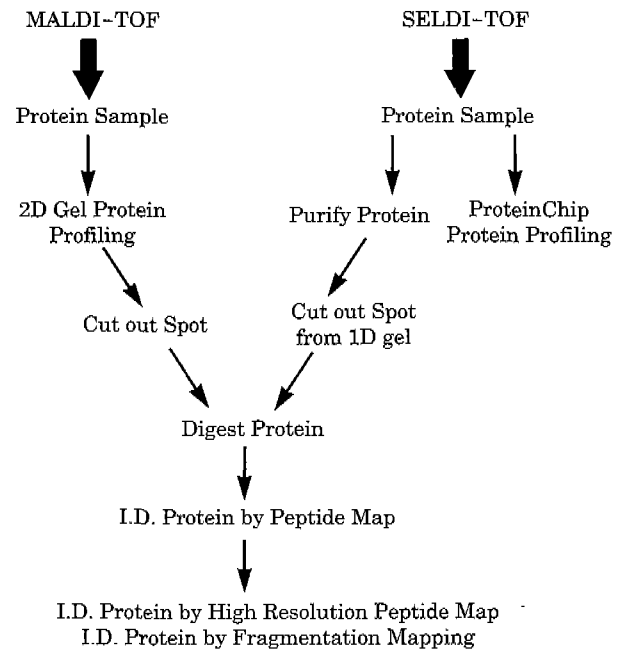


Fig. 1. Scheme of proteomics.

대상 특정 단백질 spot들의 분리 양상을 지도로 구성할 수 있다. 문제는 이렇게 발견된 단백질의 신규성(novelty) 여부와 기능의 다양성을 알아내는 것이다. 이를 위해 특정 단백질 spot을 gel로부터 분리하여 고순도 trypsin을 처리한 peptide 조각들을 MALDI-TOF 또는 SELDI-TOF 등의 단백질 질량분석기로 분석하고 아미노산 서열을 결정한 후 단백질이나 genome dBase를 bioinformatics로 찾아 단백질의 정체체를 확인한다(Fig. 1). 이후 이 단백질의 신규성과 cDNA를 찾아 세포 내에서 과다 발현시켜 in vitro에서 효소활성을 분석하거나 해당 유전자의 적중(knock-out) 동물이나 변이세포를 사용하여 그 유전자의 기능을 검증(target validation)한다(Jungblut *et al.* 1999; Loo *et al.* 1999; Gevaert and Vandekerckhove 2000; Nelson *et al.* 2000; Hamdan *et al.* 2001; Laurell *et al.* 2001; Lay 2001; Mann *et al.* 2001; Papac and Shahrokh 2001).

### 4. 단백질칩

단백질칩(protein chip)과 SELDI는 2D/E와 함께 프로테오믹스 기술의 중요한 분야로 활용되고 있다. DNA 칩 처럼 항체나 항원, 또는 전사인자 및 ion-exchanger, hydrophobic surface를 칩표면에 고정시켜 대단위로 스크리닝하거나 표적분자인식에 사용한다. CIPHERGEN의 SELDI protein chip이 대표적인데(Hampel *et al.* 2001;

Paweletz *et al.* 2001; Verma *et al.* 2001; Wulfkuhle *et al.* 2001; Fung and Enderwick 2002; Issaq *et al.* 2002; Li *et al.* 2002; Wu *et al.* 2002), 여기에는 His-tagged 단백질, GST-fusion 단백질 등을 target 단백질로 활용하고 있는데 이를 이용하면 극미량의 샘플에서 이것과 결합할 수 있는 관련 단백질을 분리할 수 있으며 직접 SELDI/MS를 이용하여 질량과 database를 이용한 펩타이드 분석이 가능하다. 단백질칩은 진단 뿐 아니라 특정단백질의 정제에도 활용이 가능하다. 실제로 Biacore 같은 기기는 단백질 칩기술의 대표적인 성과로서 단백질간, 또는 단백질과 물질들의 결합 kinetics, 정량분석을 가능하게 하는 분석기기이다. 중요한 것은 칩에 붙이는 단백질 탐침의 특이성과 안정성과 칩 표면에 코팅하는 기술이다. Protein chip과 SELDI를 ProteinChip System이라고 부르며, 단백질 뿐만 아니라 펩타이드(peptide)와 저 분자량의 물질 등의 분석에도 적용될 수 있다. 그 공정의 대부분은 일련의 부착(binding)과 세척(washing)과정을 수반한다. 준비된 생물학적 시료(단백질) microliter ( $\mu$ l)를 ProteinChip array에 올려놓으면 화학적으로 특별히 표면 처리되었거나 생화학분자가 covalent하게 부착된 array의 표면에 붙게된다(Fig. 2). Sample 안의 일련의 단백질의 특별한 포착(specific capture)이 간단한 화학적 상호작용(e.g. reverse phase, ion exchange, metal ion binding) 또는 단백질간의 상호작용(affinity capture 등)을 통해 일어난다. 부착과 세척 후 chip 표면에 보존된 시료에 에너지 흡수물질(energy absorbing molecule, EAM)용액을 공급해주고, 이 유기용액에 녹인 EAM을 주입하여 protein을 EAM과 함께 용액 속에 녹인다. Chip 위의 용액이 마른 후, 과량의 EAM과 단백질(또는 분석물질)이 결정(crystal)을 형성하며, EAM은 시료의 이온화(ionization)를 증대하는데 필수적이다. 이렇게 만들어진 metal chip 위의 시료는 Mass Spectrometry분석을 위하여 ProteinChip Reader에 옮겨지고 여러 번의 레이저 빔(laser beam)이 특정 부분에 쏘아져, 먼저 이

은상태로 그리고 고체를 기체상태로 만들어 시료를 날아(fly)가게 한다. ProteinChip Reader는 분석물질의 비거리(time of flight)를 기록하고 이런 측정으로부터 고도의 정확한 분자량이 얻어진다. SELDI의 특성은 crude한 생물시료들을 labeling이나 화학적 변화를 주지 않고 직접 잡아 감지하고 분석할 수 있게 해준다. ProteinChip software는 ProteinChip arrays에 있는 시료로부터 모든 양상의 data를 조절하고, 분석과 해석을 가능하게 한다. 더불어 SELDI는 일련의 on-chip 효소적 진행과정(예, deglycosylation, peptide mapping)을 이용하여 단백질 특성분석 연구가 가능하다. 더 나아가 간단히 몇 일 안에 수 백 개의 시료를 screen할 수 있는 장점 등이 있다. SELDI system을 이용하는데 크게 profiling과 protein identification으로 나뉘며, ProteinChip상에서 protein immunoassay, protein-protein interaction, DNA- or RNA-binding protein assay, metal-protein binding protein의 확인 및 ion exchange를 이용한 부분적 정제를 수행할 수 있다.

5. 데이터베이스

프로테오믹스 연구에 가장 중요한 자원중의 하나는 샘플을 2D/E로 분석한 전형적인 패턴이나 각종 펩타이드의 mass-finger printing을 저장하고 이를 기반으로 동 분야 연구진들이 활용할 수 있게 data로 구축하고 활용하는 dBase system이다(Bairoch, 1997). 약물또는 독성물질의 표적으로 확인된 단백질의 신규성 유무 판별에도 필수적이다. 특히 단백질의 발현 profile을 만들어 임상시험이나 전임상 독성연구에 활용함은 매우 중요하다. 이러한 단백질 발현양상을 특정약물에 대해 얻을 경우 부작용의 예측이나 약리효능 분석, 내성연구 및 내성회피 표적을 발굴할 수 있다. 현재 website에는 프로테오믹스 분석을 위한 갖가지 정보가 가용하다. 대표적인 것이 NCBI 또는 SwissProt으로 2D/E gel 패턴을 샘플

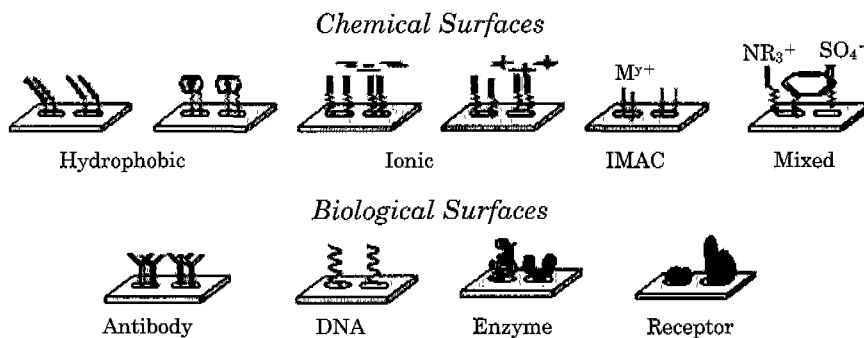


Fig. 2. Types of chip surface for affinity binding.

origin 별로 구분하여 구축한 것이다. 현재 기술상의 문제점으로는 샘플원의 분석에 따른 재현성 문제로 각종 시료에 대한 표준화된 전처리(예, 용액화 등)와 2D/E gel 분석조건 등의 구축이 요구된다(Link 1999).

## 6. 응용

프로테오믹스의 주요 적용대상 중 하나는 각 샘플(세포, 조직, 체액 등)을 처리 시 나타나는 다양한 표현형의 차이(differential display)의 패턴을 비교할 수 있는 수단을 제공하는 것이다. 유전체학과 proteomics 간 가장 큰 차이점은 phosphorylation, glycosylation, methylation, farnesylation 등 단백질만이 갖는 변형패턴의 규명이 가능하다는 점이다. 이러한 변형패턴은 실질적으로 그 단백질의 기능을 결정짓는 요인이므로 이것에 근거하여 단백질의 식별과 특성연구를 할 수 있는 것은 프로테오믹스만이 갖는 핵심기술이다. 이러한 변형은 세포분열, 질병, 감염, 외부에서 투여된 독성물질에 의해 다양하게 일어나므로 프로테오믹스를 이용하여 이를 분석하는 것은 중요한 의미를 가진다. Quantitative 프로테오믹스 기술은 세포의 상태별로 특정단백질의 분포와 농도차이 변화를 in vivo에서 표지한 후 MALDI-MASS로 분석하는 기술이다(Mann 1999). 이 방법으로 한 유전자로부터 만들어지는 유사한 단백질류를 효과적으로 정량할 수 있으며 yeast와 박테리아 등의 배양시 특정단백질을 tagging하면 성장조건에 따른 분포변화를 정량할 수 있다. Protein-protein interaction에서 프로테오믹스를 활용하면 세포 내 각종 단백질들 간의 결합이나 상호작용을 파악하는데 중요한 정보를 얻을 수 있다. 예를 들면 G-protein 관련 신호전달 과정에서 각 단백질들이 일련의 oligomerization을 하거나, 그들간의 non-covalent 결합을 2D/E gel(native gel)로 분석하면 yeast two-hybrid system이나 Western blotting에 비해 간편하게 단백질간의 관계를 파악할 수 있다(Godovac-Zimmermann *et al.* 1999).

### 내분비계장애물질에 의해 유도되는 biomarker발굴과 프로테오믹스

#### 1. 프로테오믹스를 이용한 생체질병 원인 단백질의 탐색

프로테오믹스를 이용한 암연구가 활발하였다. 그 예로 Jungblut 등(1999)에 의해 암조직의 일부를 2D/E 분석을 통해 암의 진전에 따라 발현이 증가되는 단백질을

식별하였고, 이것이 calgranulin B(calprotectin)임을 밝혀낸 바 있다. 이와 관련하여 현재까지 60여 개의 암세포주에 대하여 2D/E dBase가 개발되었으며 이들 단백질 spots과 4000여 개의 약물간의 관계가 설정되었다(Myers *et al.* 1995). 감염성 질환 연구사례로는 프로테오믹스를 사용하여 TB의 주요 원인인 mycobacterium의 2D/E map 분석과 이들 균주들에 대한 proteome 연구용 dBase가 구축되었다(Mollenkopf *et al.* 1999). 이러한 전염성 균주들을 내성과 비내성 등으로 구분하여 각각의 proteome 분석을 실시한 결과 700여 종의 특정 단백질들의 존재가 확인되었고, 이들 중 일부는 TB의 진단과 치료에 중요한 단서로 이용된다. 항비만 관련 연구로 obese mice들의 PPAR(peroxisome proliferation activator regulator) 전사인자들의 isoform에 대한 proteome 분석을 항비만 약물(예, WY14,643) 투여 전후를 통해 실시하여, 최소한 16개 spot의 단백질 군의 발현이 증가되고 이들 중 14개 spots이 peroxisomal fatty acid 대사에 관여하는 단백질을 확인하였고 이로 인해 항비만제의 작용기전이 peroxisome에서 지방산 산화(b-oxidation)를 촉진함을 규명하였다(Edvardsson *et al.* 1999). 생식기전 연구로는 주요 생식기관인 testis, ovary, placenta, endometrium, oviduct 등의 조직들에서 reproductive toxicants에 의한 변화, 질환 상태 등에서 호르몬이나 cytokine의 효과를 추적 및 착상 부전이나 유산 등을 일으키는 원인단백질 조사에 응용되고 있다(Halling 1993; Smith *et al.* 1998). Center for Reconstruct Gamete Contraceptive Vaccinogen에서는 1400개의 단백질 군을 갖는 인간의 spermatozoa를 proteome 분석을 통해 구축한 바 있으며(Naaby-Hansen *et al.* 1997), 이를 이용하여 불임치료를 위해 불임 남녀들의 혈청 내 항정자 항체에 의해 인식되는 단백질을 확인한 바 있다(Brewis 1999). 약물독성 연구분야에서는 2D/E를 이용하여 단백질 발현의 정량적인 분석으로 다양한 약물의 영향과 세포에 대한 독성을 연구할 수 있다(Marzocchi *et al.* 1995; Myers *et al.* 1995). 이 밖에도 Src SH domain과 결합하는 저해제(Giuliani *et al.* 2000), 네오마이신의 aminoglycoside와 HIV Tat 펩타이드-TAR RNA 간의 결합 등에 대하여 프로테오믹스로 분석하는 기법이 보고된 바 있다(Loo *et al.* 1999).

#### 2. 내분비계장애물질에 의해 유도되는 단백질의 탐색과 프로테오믹스

최근 흥합에 PCB, copper, 또는 염분으로 스트레스를 유발시켜 단백질 발현 변화를 2D/E로 분석하거나(Shepard



*et al.* 2000), c-Src protein이 dioxin (TCDD)에 의해 mouse fibroblast cells 안에서 hsp90와 함께 cytosolic AhR-complex와 반응함을 2D/E와  $^{32}\text{P}$  labeled autoradiography를 이용하여 연구되었고 (Enan and Matsu-mura 1996), PCB 및 dioxin에 의해 쥐의 간 및 태반에서 유도되는 단백질의 변화를 2D/E로 분석하거나 (Aoki *et al.* 1991, 1992; Ishimura *et al.* 2002), photoaffinity-labeled된 AhR의 heterogeneity를 2D/E로 분석한 연구가 있지만 (Perdew and Hollenback 1990) 대부분 MALDI를 사용하지 않았다. 그 이유는 최근에야 MALDI나 SELDI의 중요성이 인식되었고, cholinesterase inhibitor, cytochrome P-450, hepatic porphyrin pattern, aminolevulinic acid dihydratase, vitellogenin 등 이미 기존에 알려진 극소수의 biomarker만을 연구에 사용하였기 때문이다. 그러나 이들 biomarker들은 다른 질병 표지자와의 연관성이 높아 직접적인 내분비계장애물질 노출위험도를 판정하기 쉽지 않으므로 앞서 언급하였듯이 내분비계장애물질에 특이적이며 새로운 biomarker의 발견은 중요한 의미를 가진다. 최근 야생의 동물에서 내분비계 장애물질 등의 환경오염물질에 의해 유발되는 단백질의 변화는 환경오염을 추적하기 위한 지표성 연구를 위해 활발하게 진행되어 어류, 양서류 등에서 vitellogenin 등 특정 biomarker 단백질의 발현에 대한 연구가 활발하였다 (Sumpter and Jobling 1995; 계와 한 2000). 환경오염물질로 잘 알려진 중금속의 경우 생체에 노출될 경우 metallothionein 등의 metal binding protein, diazepam binding inhibitor와 thymosin-beta 4 등을 유도한다 (Quintanilla-Vega *et al.* 1995; Smith *et al.* 1998). 그러나 이와 같은 연구의 대부분은 proteomics를 접목하지 못하고 생리학적인 연구에서 얻어진 특정 biomarker 유전자 또는 단백질의 발현정도를 분석하는 것에 머물러 있다. 향후 환경오염 문제가 인체의 건강 뿐 아니라 생태계에 존재하는 다양한 생물자원에 미치는 위해성에 대한 평가의 중요성이 더욱 증가될 것으로 예상되므로 다량으로 유전자발현의 변화를 검색하기 위한 도구적 수단으로서 이 분야에서 proteomics의 도입은 매우 중요한 것으로 판단된다 (Bradley and Theodorakis 2002). 내분비계 장애물질을 포함한 기존 유해화학물질에 대한 target protein이 조사된 예는 많지 않다. 따라서 이들에 노출된 사람 또는 동물 중에서 target protein을 검색하기 위해서는 다양한 화학물질 중에서 어떤 것을 선택할 것인가, 또한 노출 수준에 따라 어떤 결과를 가져올 것인지 불확실한 부분들이 크다. 또한 진단기술의 산업화 가능성을 고려할 때 산업현장에서 많이 사용되는 화학물질이나 많은 사람들에게 노출되는 물질을

선정할 필요성도 있다 (Andersen 2002). 유해화학물질 선정을 위한 내용은 크게 두 가지로 구분된다. 첫째는 국내외적으로 연구가 진행되고 있는 단백질을 중심으로 유해화학물질을 선정하여 연구를 진행하는 방법이고, 둘째는 많이 사용되고 있는 유해화학물질에 의해 유도되는 novel protein을 찾기 위해 어떤 유해화학물질을 선정할 것인가를 결정하는 것이다. 첫째 방법을 위해서는 기존 문헌에 대한 연구, 검사 방법에 대한 평가 등이 필요하며, 둘째 방법을 위해서는 유해화학물질 사용 실태, 환경 오염 실태 등의 자료 및 novel protein을 찾을 가능성에 대한 평가가 필요하다.

## 적 요

환경오염이 심각해짐에 따라 국내외적으로 환경에 대한 관심이 고조되고 인체에 해를 끼치는 환경오염인으로부터 방어하기 위한 많은 노력이 기울여지고 있다. 특히 내분비계장애물질이 생식기능과 면역기능을 약화시키고, 행동 이상을 일으키며, 암 발생률을 높인다는 점이 밝혀지기 시작하면서 많은 연구들이 발표되고 여러 가지 방법들이 내분비계장애물질과 더불어 환경분야연구에 응용되어왔지만 단백질을 대상으로 연구하여 유전자 기능을 연구하는 프로테오믹스 (proteomics) 연구를 접목시키려는 시도가 아직까지는 빈약하다. 프로테오믹스는 기능을 갖는 단백질들의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정하는 가장 직접적인 수단이고, 질병, 약물투여, shock 등 생물학적인 동요 (perturbation)에 의하여 변하는 단백질들의 발현양상의 변화를 정확하게 관찰할 수 있으며, 생체내 유전자발현의 궁극적인 양상을 규명할 수 있고, 또한 유전자, 단백질 및 질병간의 연결고리를 제공한다. 기존의 biomarker는 다른 질병 표지자와 연관성이 높아 직접적인 유해물질 노출 위험도를 정확히 판정하기 어렵다. 따라서 대량발굴탐색 (high-throughput screening)이 가능한 2차원 전기영동 분석과 MALDI-TOF 또는 protein chip array와 SELDI-TOF에 의한 단백질 분자구조 분석기술 및 이들을 지원하는 생물정보학 (bioinformatics)의 발전을 이용하여 환경독성 연구에 이용할 수 있는 표적단백질 (biomarker) 발굴에 적절한 이용이 가능할 것이다.

## 인 용 문 헌

계명찬, 한명수. 2000. 척추동물의 난황형성과 환경에스트로

- 제. 한국환경생물학회지. 18:291-298.
- Andersen ME, JJ Mills, RL Jirtle and WF Greenlee. 1995. Negative selection in hepatic tumor promotion in relation to cancer risk assessment. *Toxicology* 102:223-237.
- Andersen ME. 2002. The use of quantitative histological and molecular data for risk assessment and biologically based model development. *Toxicol. Pathol.* 30:106-111.
- Anderson LM, BL Eebe, SD Fox, HJ Issaq and RM Kovatch. 1991. Promotion of mouse lung tumors by bioaccumulated polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Exp. Lung Res.* 17:455-471.
- Aoki Y, K Satoh, K Sato and KT Suzuki. 1992. Induction of glutathione S-transferase P-form in primary cultured rat liver parenchymal cells by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Biochem. J.* 281:539-543.
- Aoki Y, EK Silbergeld, SR Max and BA Fowler. 1991. Alterations in protein synthesis in rat liver cells by in vitro and in vivo exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem. Pharmacol.* 42:1195-1201.
- Apffel A, J Chakel, S Udiavar, S Swedberg, WS Hancock, C Souders and E Pungor Jr. 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 MR Wilkins, KL Williams, RD Appel and DF Hochstrasser (eds.), *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer, Berlin. p. 93-148.
- Barouki R and Y Morel. 2001. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.* 61:511-516.
- Belinsky M and AK Jaiswal. 1993. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 12:103-117.
- Berndt P, U Hobohm, and H Langen. 1999. Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *Electrophoresis.* 20:3521-3526.
- Blackstock WP and MP Weir. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17:121-127.
- Blaustein A, D Wake and W Sousa. 1994. Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.* 8:60-71.
- Bradley B, C Theodorakis. 2002. The post-genomic era and ecotoxicology. *Ecotoxicology* 11:7-9.
- Brewis IA. 1999. Proteomics in reproductive research: the potential importance of proteomics to research in reproduction. *Hum. Reprod.* 14:2927-2929.
- Brown JF Jr, RW Lawton and CB Morgan. 1994. PCB metabolism, persistence, and health effects after occupational exposure: implications for risk assessment. *Chemosphere* 29:2287-2294.
- Clarke DJ, B Burchell and SG George. 1992. Differential expression and induction of UDP-glucuronosyltransferase isoforms in hepatic and extrahepatic tissues of a fish, *Pleuronectes platessa*: immunochemical and functional characterization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115:130-136.
- Colborn T, D Dumanoski and JP Myers. 1996. *Our Stolen Future*. The Spieler Agency.
- De Jongh J, M DeVito, R Nieboer, L Birnbaum and M Van den Berg. 1995. Induction of cytochrome P450 isoenzymes after toxicokinetic interactions between 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl in the liver of the mouse. *Fundam. Appl. Toxicol.* 25:264-270.
- De Matteis F and GS Marks. 1996. Cytochrome P450 and its interactions with the heme biosynthetic pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74:1-8.
- Dobashi K, K Asayama, T Nakane, H Hayashibe, K Kodera, N Uchida and S Nakazawa. 1999. Effect of peroxisome proliferator on extracellular glutathione peroxidase in rat. *Free Radic. Res.* 31:181-190.
- DeRosa C, P Richter, H Pohl and DE Jones. 1998. Environmental exposures that affect the endocrine system: public health implications. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 1:3-26.
- Dragan YP and D Schrenk. 2000. Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. *Food Addit. Contam.* 17:289-302.
- Edvardsson U, M Alexandersson, VL Brockenhuus, AC Nystrom, B Ljung, F Nilsson and B Dahllof. 1999. A proteome analysis of livers from obese (ob/ob) mice treated with the peroxisome proliferator WY14,643. *Electrophoresis* 20:935-942.
- Enan E and F Matsumura. 1996. Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.* 52:1599-1612.
- Fung ET and C Enderwick. 2002. ProteinChip clinical proteomics: computational challenges and solutions. *Biotechniques. Suppl.* 34:8, 40-1.
- Gevaert K and J Vandekerckhove. 2000. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21:1145

- 1154.
- Giuliani A, P Sirabella, R Benigni, A Colosimo. 2000. Mapping protein sequence spaces by recurrence quantification analysis: a case study on chimeric structures. *Protein. Eng.* 13:671-8.
- Godovac-Zimmermann J, V Soskic, S Poznanovic and F Brianza. 1999. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 20:952-961.
- Goldman JM, SC Laws, SK Balchak, RL Cooper and RJ Kavlock. 2000. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDS-TAC recommendations. *Crit. Rev. Toxicol.* 30:135-196.
- Gonzalez FJ and P Fernandez-Salguero. 1998. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug. Metab. Dispos.* 26:1194-1198.
- Gray LE Jr. 1998. Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol. Lett.* 102-103:677-680.
- Guillette LJ Jr. 2000. Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. *Growth Horm. IGF Res.* 10 Suppl B:S45-50.
- Halling A. 1993. Altered patterns of proteins released in vitro from oviductal and uterine tissue from adult female mice treated neonatally with diethylstilbestrol. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44:227-237.
- Hamdan M, E Bordini, M Galvani and PG Righetti. 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, C Sansome, M Sha, S Brodsky, WE Lawson and MS Goligorsky. 2001. Toward proteomics in uroscopy: urinary protein profiles after radiocontrast medium administration. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1026-1035.
- Harper N, K Connor, M Steinberg and S Safe. 1994. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific for antibodies to TNP-LPS detects alterations in serum immunoglobulins and isotype switching in C57BL/6 and DBA/2 mice exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Toxicology* 92:155-167.
- Hendry WJ 3rd, DM Sheehan, SA Khan and JV May. 2002. Developing a laboratory animal model for perinatal endocrine disruption: the hamster chronicles. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 227:709-723.
- Hoyer PB. 2001. Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem. Pharmacol.* 62:1557-1564.
- Hutchinson TH, R Brown, KE Brugger, PM Campbell, M Holt, R Lange, P McCahon, LJ Tattersfield and R van Egmond. 2000. Ecological risk assessment of endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* 108:1007-1014.
- Ishimura R, S Ohsako, T Kawakami, M Sakaue, Y Aoki and C Tohyama. 2002. Altered protein profile and possible hypoxia in the placenta of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185:197-206.
- Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP and 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.
- Johnson CW, WC Williams, CB Copeland, MJ De Vito and Smialowicz RJ. 2000. Sensitivity of the SRBC PFC assay versus ELISA for detection of immunosuppression by TCDD and TCDD-like congeners. *Toxicology* 156: 1-11.
- Jungblut PR, U Zimny-Arndt, E Zeindl-Eberhart, J Stulik, K Koupilova, KP Pleissner, A Otto, EC Muller, W Sokolowska-Kohler, G Grabher and G Stoffler. 1999. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 20:2100-2110.
- Kanetoshi A, AM Ward, BK May and AB Rifkind. 1992. Immunochemical identity of the 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin- and beta-naphthoflavone-induced cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenases in chick embryo liver: distinction from the omega-hydroxylase and the phenobarbital-induced epoxygenase. *Mol. Pharmacol.* 42:1020-1026.
- Kavlock RJ. 1999. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. *Chemosphere* 39: 1227-1236.
- Kimmel CA and SL Makris. 2001. Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. *Toxicol. Lett.* 120:73-82.
- Kleman M and JA Gustafsson. 1996. Interactions of procarcinogenic heterocyclic amines and indolocarbazoles with the dioxin receptor. *Biol Chem.* 377:741-762.
- Korytko PJ, AC Casey, B Bush and FW Quimby. 1999. Induction of hepatic cytochromes P450 in dogs exposed to a chronic low dose of polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Sci.* 47:52-61.
- Laschi S and M Mascini. 2002. Disposable electrochemical immunosensor for environmental applications. *Ann. Chim.* 92:425-433.
- Lathers CM. 2002. Endocrine disruptors: a new scientific

- role for clinical pharmacologists? Impact on human health, wildlife, and the environment. *Clin. Pharmacol.* 42:7-23.
- Laurell T, G Marko-Varga, S Ekstrom, M Bengtsson and J Nilsson. 2001. Microfluidic components for protein characterization. *J. Biotechnol.* 82:161-75.
- Lay JO Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. 2001. *Mass. Spectrom. Rev.* 20:172-194.
- Li J, Z Zhang, J Rosenzweig, YY Wang and DW Chan. 2002. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin. Chem.* 48:1296-1304.
- Link AJ. 1999. 2D Proteome Analysis Protocol in *Methods in Molecular Biology*. vol., 112, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Loo JA, DE DeJohn, P Du, TI Stevenson, Ogorzalek and RR Loo. 1999. Application of mass spectrometry for target identification and characterization. *Med. Res. Rev.* 19:307-319.
- Ma Q. 2001. Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr. Drug. Metab.* 2:149-164.
- Mann M, RC Hendrickson and A Pandey. 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70:437-473.
- Mann M. 1999. Quantitative proteomics [news]. *Nat. Biotechnol.* 17:954-955.
- Marzocchi B, B Magi, L Bini, C Cellesi, A Rossolini, O Massidda and V Pallini. 1995. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of human serum albumin modified by reaction with penicillins. *Electrophoresis* 16:851-853.
- Mollenkopf HJ, PR Jungblut, B Raupach, J Mattow, S Lamer, U Zimny-Arndt, UE Schaible and SH Kaufmann. 1999. A dynamic two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database of the mycobacterial proteome via Internet. *Electrophoresis* 20:2172-2180.
- Mori C. 2001. Possible effects of endocrine disruptors on male reproductive function. *Kaibogaku. Zasshi.* 76:361-368.
- Myers TG, EC Dietz, NL Anderson, EA Khairallah, SD Cohen and SD Nelson. 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, CJ Flickinger and JC Herr. 1997. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56:771-787.
- Nebert DW and JJ Duffy. 1997. How knockout mouse lines will be used to study the role of drug-metabolizing enzymes and their receptors during reproduction and development, and in environmental toxicity, cancer, and oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 53:249-254.
- Nebert DW, AL Roe, MZ Dieter, WA Solis, Y Yang and TP Dalton. 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59:65-85.
- Nebert DW, DD Petersen and A Puga. 1991. Human AH locus polymorphism and cancer: inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin. *Pharmacogenetics.* 1:68-78.
- Nelson RW, D Nedelkov and KA Tubbs. 2000. Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach. *Electrophoresis* 21:1155-1163.
- Nguyen DN, GW Becker and RMRiggin. 1995. Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology. *J. Chromatogr. A.* 705:21-45.
- Nielsen M, PE Hoyer, JG Lemmen, B van der Burg and AG Byskov. 2000. Octylphenol does not mimic diethylstilbestrol-induced oestrogen receptor- $\alpha$  expression in the newborn mouse uterine epithelium after prenatal exposure. *J. Endocrinol.* 167:29-37.
- Nilsson R. 2000. Endocrine modulators in the food chain and environment. *Toxicol. Pathol.* 28:420-431.
- Oberdorster E and AO Cheek. 2001. Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:23-36.
- Oesch F, M Arand, MW Coughtrie, B Burchell and P Steinberg. 1992. The distribution of UDP-glucuronosyltransferases in rat liver parenchymal and nonparenchymal cells. *Biochem. Pharmacol.* 43:731-737.
- Okey AB, DS Riddick and PA Harper. 1994. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol. Lett.* 70:1-22.
- Olea N, P Pazos and J Exposito. 1998. Inadvertent exposure to xenoestrogens. *Eur J Cancer. Prev.* 7 Suppl 1: S17-23.
- Osteen KG and E Sierra-Rivera. 1997. Does disruption of immune and endocrine systems by environmental toxins contribute to development of endometriosis? *Semin. Reprod. Endocrinol.* 15:301-308.
- Papac D and Z Shahrokh. 2001. Mass spectrometry innovations in drug discovery and development. *Pharm. Res.* 18:131-145.
- Paweletz CP, B Trock, M Pennanen, T Tsangaris, C Magnant, LA Liotta and EF Petricoin 3rd. 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.
- Perdew GH. 1988. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 263:13802-13805.
- Perdew GH and CE Hollenback. 1990. Analysis of photoaffinity-labeled aryl hydrocarbon receptor heterogeneity by two-dimensional gel electrophoresis. *Biochemistry* 29:6210-6214.
- Quintanilla-Vega B, DR Smith, MW Kahng, JM Hernandez, A Albores and BA Fowler. 1995. Lead-binding proteins in brain tissue of environmentally lead-exposed humans. *Chem Biol Interact* 98:193-209.
- Reijnders PJ. 1994. Toxicokinetics of chlorobiphenyls and associated physiological responses in marine mammals, with particular reference to their potential for ecotoxicological risk assessment. *Sci. Total. Environ.* 154:229-236.
- Reiners JJ Jr, CL Jones, N Hong, RE Clift and C Elferink. 1997. Downregulation of aryl hydrocarbon receptor function and cytochrome P450 1A1 induction by expression of Ha-ras oncogenes. *Mol. Carcinog.* 19:91-100.
- Rifkind AB, A Kanetoshi, J Orlinick, JH Capdevila and C Lee. 1994. Purification and biochemical characterization of two major cytochrome P-450 isoforms induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chick embryo liver. *J. Biol. Chem.* 269:3387-3396.
- Safe SH. 2000. Endocrine disruptors and human health—is there a problem? An update. *Environ. Health. Perspect.* 108:487-493.
- Schulz TG, D Neubert, DD Savies and RJ Edwards. 1996. Inducibility of cytochromes P-450 by dioxin in liver and extrahepatic tissues of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1298:131-140.
- Shepard JL, B Olsson, M Tedengren and BP Bradley. 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar. Environ. Res.* 50:337-340.
- Smeets JM, I van Holsteijn, JP Giesy, W Seinen and M van den Berg. 1999. Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. *Toxicol. Sci.* 50:206-213.
- Smith DR, MW Kahng, B Quintanilla-Vega and BA Fowler. 1998. High-affinity renal lead-binding proteins in environmentally-exposed humans. *Chem. Biol. Interact.* 115:39-52.
- Spearow JL and M Barkley. 2001. Reassessment of models used to test xenobiotics for oestrogenic potency is overdue. *Hum. Reprod.* 16:1027-1029.
- Stebbin R and N Cohen. 1995. *A Natural History of Amphibians*. Princeton Univ. Press.
- Stegeman JJ, JJ Schlezinger, JE Craddock and DE Tillitt. 2001. Cytochrome P450 1A expression in midwater fishes: potential effects of chemical contaminants in remote oceanic zones. *Environ. Sci. Technol.* 35:54-62.
- Sugawara Y, K Saito, MO Gawa, S Kobayashi, G Shan, JR Sanborn, BD Hammock, H Nakazawa and Y Matsuki. 2002. Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay—assay validation for human milk. *Chemosphere* 46:1471-1476.
- Sumpter JP and S Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health. Perspect.* 103 Suppl 7:173-178.
- Takeuchi T and O Tsutsumi. 2002. Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:76-78.
- Thomas PE, LM Reik, DE Ryan and W Levin. 1983. Induction of two immunochemically related rat liver cytochrome P-450 isozymes, cytochromes P-450c and P-450d, by structurally diverse xenobiotics. *J. Biol. Chem.* 258:4590-4598.
- Tian Y, A Rabson and M Gallo. 2002. Ah receptor and NF-kappaB interactions: mechanisms and physiological implications. *Chem. Biol. Interact.* 20:141:97.
- Turusov V, V Rakitsky and L Tomatis. 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. *Environ. Health. Perspect.* 110:125-128.
- Verma M, GL Wright, SM Hanash, R Gopal-Srivastava and S Srivastava. 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.
- Voorman R and SD Aust. 1987. Specific binding of polyhalogenated aromatic hydrocarbon inducers of cytochrome P-450d to the cytochrome and inhibition of its estradiol 2-hydroxylase activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90:69-78.
- Walker CH. 1998. Avian forms of cytochrome P450. *Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121:65-72.
- Whaley DA, D Keyes and B Khorrami. 2001. Incorporation of endocrine disruption into chemical hazard scoring for pollution prevention and current list of endocrine disrupting chemicals. *Drug. Chem. Toxicol.* 24:359-420.
- Wu W, W Hu and JJ Kavanagh. 2002. Proteomics in cancer

- research. *Int. J. Gynecol. Cancer* 12:409–423.
- Wulfschlegel JD, KC McLean, CP Paweletz, DC Sgroi, TB Jrock, PS Steeg and EF Petricoin. 2001. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 1:1205–1215.
- Zacharewski T. 1998. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. *Environ. Health. Perspect.* 106 Suppl 2:577–582.
- Zajicek JL, DE Tillitt, TR Schwartz, CJ Schmitt and RO Harrison. 2000. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to gas chromatography (GC)–measurement of polychlorinated biphenyls (PCBs) in selected US fish extracts. *Chemosphere* 40: 539–548.

Manuscript Received: February 14, 2003

Revision Accepted: March 6, 2003

Responsible Editorial Member: Saywa Kim  
(Yong-In Univ.)