

## 메타프로테오믹스의 미생물생태학적 응용

김종식<sup>†\*</sup> · 우정희<sup>†</sup> · 김준태 · 박년호 · 김충곤  
경북해양바이오산업연구원

### Metaproteomics in Microbial Ecology

Jong-Shik Kim<sup>†\*</sup>, Jung-Hee Woo<sup>†</sup>, Jun-Tae Kim, Nyun-Ho Park, and Choong-Gon Kim

Gyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry (GIMB), Gyeongbuk 767-813, Republic of Korea

(Received March 2, 2010/Accepted March 19, 2010)

New technologies are providing unprecedented knowledge into microbial community structure and functions. Even though nucleic acid based approaches provide a lot of information, metaproteomics could provide a high-resolution representation of genotypic and phenotypic traits of distinct microbial communities. Analyzing the metagenome from different microbial ecosystems, metaproteomics has been applied to seawater, human guts, activated sludge, acid mine drainage biofilm, and soil. Although these studies employed different approaches, they elucidated that metaproteomics could provide a link among microbial community structure, function, physiology, interaction, ecology, and evolution. These approaches are reviewed here to help gain insights into the function of microbial community in ecosystems.

**Keywords:** mass spectrometry, metaproteomics, microbial community, shot-gun analysis

메타프로테오믹스(metaproteomics)는 “환경 미생물 군집 내의 전체 단백질들에 대한 프로테오믹스 분석과 관련된 연구분야”(39)로 meta는 그리스어로 “초월”을, 프로테오믹스(proteomics)는 하나의 생명체, 조직 혹은 세포의 모든 단백질들로 정의될 수 있는 프로테오믹스와 관련된 연구 분야를 뜻한다(11). 이러한 메타프로테오믹스는 생태계 내에서 미생물의 기능적 발현을 연구하기 위해 mRNA 수준을 넘어 미생물 군집구조와 환경인자에 의한 그 발현 양상을 포괄적으로 이해하는 데에 도움을 주고, 의학과 환경 미생물학 발전에 가장 큰 장벽인 배양 불능과 미생물의 프로테오믹스 지나치게 다양하다는 두 가지 문제를 해결해 줄 수 있다.

이와 같이 새로운 과학인 메타프로테오믹스는, 또한 “Environmental proteomics”, “Microbial community proteomics”라고도 불리는데(17, 40, 42), 미생물학의 새로운 연구 기법으로서 배양되지 않은 미생물에 대한 풍부한 정보를 제공한다. 그 연구 전략을 정리한 것이 Fig. 1이며, 메타프로테오믹스 연구들은 (i) 해수 등의 시료의 채취, 농축, 전체 단백질의 추출 및 분리, (ii) 추출 및 분리된 단백질의 총망라된 분석 또는 선발된 단백질의 분석을 통한 동정 (iii) 생태계 내의 미생물 군집구조와 기능과의 관계를 규명하기 위한 단백질 D/B 및 검색

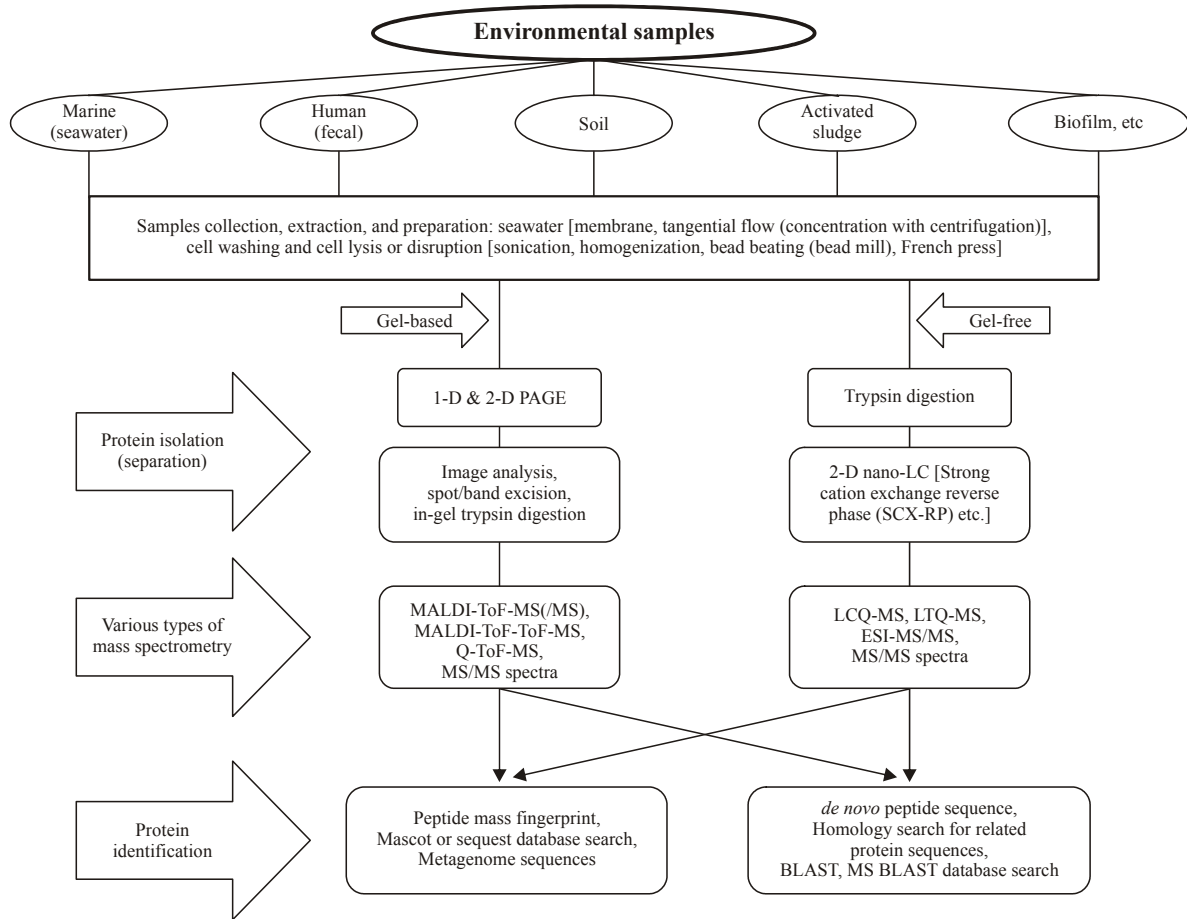
엔진의 활용 등 세가지로 분류할 수 있다(Tables 1, 2, and 3). 현재까지 메타프로테오믹스 연구는 총설(5, 7, 10, 13, 23, 34, 44)을 비롯하여, 해양(14, 24, 28, 31), 인간의 배설물(15, 36), 토양 및 근권(3, 4, 6, 8, 19, 27, 29, 32), 그 외 생물막(1, 25), 활성슬러지(21, 38, 41, 43) 등의 다양한 미생물 생태계에 적용되어왔다.

메타프로테오믹스는 마치 상자 안에 부어진 수천 개의 조각 그림 퍼즐과 같아서 이 퍼즐을 다시 짜맞추기와 같은 아주 어려운 도전을 해야 했다. 하지만 현재 메타프로테오믹스의 연구는 초고속 정밀 분석기와 그리고 미생물 단백질의 분석에 필요한 컴퓨터 처리 능력의 발전으로 보다 정확하고 신속한 분석이 가능하게 되었다.

메타프로테오믹스는 미생물 군집에 대한 방대한 양의 정보를 제공한다. 예를 들면 Sargasso Sea 서식 미생물들에 대한 메타지노믹스 연구가 진행된 이후(26, 33, 35, 37) 프로테오믹스 연구는 배양된 미생물 연구에 비해 예상보다 더욱 다양한 프로테오믹스들의 종류를 나타낼 수 있었다(9, 31). 또한 금속 광산의 극산성 폐수에서 생물막을 형성하는 단순한 미생물 군집의 연구는 미생물 군집 구성원들 간의 세부적인 상호 작용들을 규명하기 위한 메타프로테오믹스의 잠재력을 증명했다(25). 이와 같은 메타프로테오믹스 기술과 응용의 연구동향을 본 총설에서 요약하도록 하겠다.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

\* For correspondence. E-mail: jskim@gimb.or.kr; Tel: +82-54-780-3451; Fax: +82-54-780-3469



**Fig. 1.** Metaproteomic analysis strategies. Abbreviations: 1-D and 2-D PAGE, one and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; 2-D-nano-LC, two-dimensional nano liquid chromatography; MS, mass spectrometry; LCQ, liquid chromatography electrospray 3D quadrupole ion trap; LTQ, liquid chromatography electrospray 2D linear ion trap; ESI, electrospray ionization; MALDI-ToF, matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight; Q-ToF, quadrupole time-of-flight.

## 본 론

### 해양의 메타프로테오믹스 연구

해양 미생물 군집을 전체적으로 이해하기 위한 해수의 메타프로테오믹스 연구가 2005년에 처음으로 수행되었다(14). Giovannoni 그룹은 Sargasso Sea에서 포괄적인 메타프로테오믹스 분석을 통해 광합성이 일어나는 수층의 미생물 군집을 분석하였고, 그곳에서 우점하는 미생물들과 연관이 있는 단백질들을 동정하였다(31). 해양 메타프로테오믹스 연구는 해수 내의 다양한 단백질의 발현 양상을 통해 포괄적으로 이해가 가능한데, 실험과정에서 해수의 여과, 수집, 농축과정이 가장 중요하다. 여과기는 목적하는 크기에 따라 0.2-3 μm를 사용했으며 해수의 양 또한 다양했다. 농축 방법으로는 tangential flow ultrafiltration (TFF)를 사용하였고(Table 1), bead beating 방법으로 단백질을 추출하였다(14, 30, 31).

단백질은 gel-based 방법과 gel-free 방법으로 분리할 수 있다. Gel-based 방법은 1-D와 2-D 전기영동법을 이용하여 단백질을 분리한 후 분리된 단백질의 영상을 분석하고 spot과 band

를 절단하여 직접 단백질 분해효소(트립신) 처리를 통해 단백질을 분해시킨다(Fig. 1). 그리고, 분해된 펩타이드 혼합물을 MALDI-TOF-MS 또는 LC-MS/MS 등의 다양한 질량분석기를 이용하여 CID, MS와 MS/MS의 스펙트럼을 찾아내어(14, 24, 31), 단백질 데이터 베이스 검색(Sequest, Mascot 그리고 NCBI)을 통해 단백질을 규명할 수 있다(Tables 2 and 3). Gel-free 방법은 shot-gun 분석법으로도 불린다. Shot-gun 분석법은 추출된 단백질을 분리하지 않고 직접 메타프로테오믹스를 트립신 처리를 통해 펩타이드 혼합물을 만들고, 이 펩타이드 혼합물을 액체 크로마토그래피로 분리한 후, 다양한 질량분석기(1-D 또는 2-D-LC-MS/MS)로 분석하고, Sequest를 통해 단백질을 동정하는 방법이다(Tables 2 and 3).

해양 메타프로테오믹스 분석 예를 보면, 미국의 Chesapeake Bay에서는 상, 중, 하부의 단백질 발현을 비교한 결과, 중부에서 NADH:UQ oxidoreductase와 predicted aminopeptidase가 특히 상부 및 하부와는 다른 발현 양상을 보였으며(14), 또한 멕시코 만 해수에서의 용존 유기물(DOM)의 메타프로테오믹스 분석 결과, membrane/envelope 단백질, 효소 등이 높게 발현되었다(24).

**Table 1.** Summary of collection, extraction, or preparation methods/techniques used in various metaproteome

Sources	Collection, extraction, or preparation methods/techniques	References
<b>Marine</b>		
Seawater (The Gulf of Mexico)	Solubilization (0.01% SDS), pre-filtration (0.2 $\mu\text{m}$ pore size), concentration by tangential flow ultrafiltration (10 kDa cut off) and methanol/chloroform/water precipitation (seawater: 60 liters)	(24)
Seawater (Chesapeake Bay, USA)	Pre-filtration (3 $\mu\text{m}$ pore size), concentration by tangential flow ultrafiltration (30 kDa cut off) and analyze Chesapeake Bay (upper, middle and lower bay) microbial community (0.2 to 3.0 $\mu\text{m}$ , seawater: 5 L)	(14)
Seawater (5 miles offshore Newport, Oregon, USA)	Solubilization (dodesyl maltoside), pre-filtration (0.8 $\mu\text{m}$ pore size), concentration (10 m, 40 liters) by tangential flow ultrafiltration (30 kDa cut off).	(9)
Seawater (Sargasso sea)	Concentration [surface water (5 m, 210 L or 240 L) by tangential flow ultrafiltration (30 kDa cut off). 1] Global and soluble/insoluble protein preparation with bead beating ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ buffer) 2) Global and soluble/insoluble protein preparation with tetrafluoroethylene (chemically lysed)	(30, 31)
<b>Human</b>		
Fecal microbiota (Infant gastrointestinal tract)	Fecal samples (0.5 g; infant A: at days 8, 24, and 41; infant B: at days 103, 117, and 144). Fecal samples were resuspended in PBS and vortexed with bead beating.	(15)
Fecal microbiota (Gut)	Two fecal samples (Samples 7 and 8) collected from two healthy female identical twins (born in 1951). Fecal samples were thawed at +4°C and microbial cells (~100 mg) were extracted from the bulk fecal material by differential centrifugation. This cell extraction method has previously been found to result in a highly enriched bacterial fraction from complex samples, such as soil and chicken feces.	(36)
<b>Soil</b>		
Rhizosphere ( <i>Arabidopsis halleri</i> )	Ground in liquid nitrogen and solubilized in 80 mM citric acid, 1% (w/v) C7Bz0 detergent, 7 M urea, 2 M thiourea, protease inhibitor cocktail, centrifuging at 40,000 $\times$ g for 2 min and the supernatant proteins were precipitated and recovered by centrifugation at 20,000 $\times$ g for 15 min.	(8)
Contaminated soil groundwater (Chlorobenzene)	Extraction of proteins from 5 g of soil, removal of humic compounds, precipitation, and washing of proteins	(3)
Sediments (Coal hydrogenation and benzene plant)	Ultrasonication bath (500 ml of sediment), combined pellets (20 mM Tris-HCl; pH 7.5), removal of sulfide compounds and washing pellets (repeated washing steps)	(4)
Agriculture soil	Sequential extraction method in citrate and SDS buffers (1 g of soil), followed by phenol extraction	(6)
Soil sediment wastewater	Boiling method and freeze-thaw method 1 g of soil, 1 g of sediment, and 10 ml of wastewater	(19)
Soil water Lake water	Filtered through a 0.2 $\mu\text{m}$ acetate filter. Membrane proio to freeze-drying. Bulk soil sampled were dried, and passed through a 2-mm sieve. Humic acids and other small molecules were removed from the soil solution by size exclusion gel filtration over Sepharose 4B	(27)
Soil sample	Bead beating, sonication, vortex or chemical lysis (1 g of soil). Isolation of microbial cells before protein extraction	(29)
Agriculture soil	Direct extraction, phenol buffer protein extraction (10 or 20 g of soil). Separation of microorganisms from 10 or 20 g of soil	(32)
<b>Activated sludge</b>		
Anaerobic sludge granules	Extraction of proteins from 50 ml of sludge. French press protocol and sonication protocol, nuclease treatment, protein (supernatants) preparation by centrifugation	(1)
Waste activated sludge	Extraction of proteins from 3 L of sludge. Base extraction (at pH 10.5) and CER (DOWEX) extraction, centrifugation, filtration (1.5 $\mu\text{m}$ filters), precipitation ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	(21)
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Mixed consortium of <i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1 and the enrichment culture UFZ-1. Cell harvesting and lysis, protein precipitation (acetone)	(12)
Complex activated sludge community from lab-scale sequencing batch reactor (SBR)	Extraction of proteins from 2 L of sludge. Precipitation (TCA), denaturation and reduction (6 M guanidine, 10 mM DTT), digestion (trypsin), desalting, filtration, concentration	(38)

Table 1. Continued

Sources	Collection, extraction, or preparation methods/techniques	References
Activated sludge from lab-scale SBR	Extraction of proteins from 2 L of sludge. Washing (0.9% w/v NaCl), cell lysis (French press, UTCHAPS lysis buffer), precipitation (TCA), washing (50 mM Tris and 80% v/v acetone), resuspending (low-, high-stringency buffers)	(39, 43)
Activated sludge from lab-scale SBR	Extraction of proteins from 2 L of sludge. Washing (0.9% w/v NaCl), cell lysis (French press, UTCHAPS lysis buffer), precipitation (TCA), washing (50 mM Tris and 80% v/v acetone), resuspending (low-stringency buffer)	(41)
<b>Wastewater</b>		
Microbial community in a continuous-flow wastewater treatment bioreactor	Cell harvesting, washing, resuspending (1st lysis buffer), 1st cell lysis (sonication), resuspending (2nd lysis buffer), 2nd cell lysis (sonication), combined protein (supernatants) preparation	(16)
<b>Freshwater</b>		
Natural freshwater samples (The Kir lake, Dijon, Burgundy, France)	Extraction of proteins from 0.6 L of freshwater. Centrifugation, resuspending (0.8% w/v NaCl), cell extraction (Nycodenz density gradient), washing (0.8% w/v NaCl, H <sub>2</sub> O), cell harvesting, cell lysis (sonication), protein purification and concentration (cleanup kit)	(22)
Freshwater samples (San Diego creek, USA)	Extraction of proteins from 15 L of sludge. Cell harvesting, resuspending, cell lysis (sonication), protein (supernatants) preparation by centrifugation	(20)
<b>Biofilm</b>		
Microbial biofilm (The Richmond mine at Iron Mountain, near Redding, California, USA)	Pink biofilms grew on the surface of sulfuric acid-rich (pH ~0.8), ~42°C solutions that contain near-molar concentrations of Fe and millimolar concentrations of Zn, Cu, and As. <i>Leptospirillum</i> group II dominated the sample, but it also contained <i>Leptospirillum</i> group III, <i>Sulfobacillus</i> , and Archaea related to <i>Ferroplasma acidarmanus</i> and "G-plasma"	(25)

그리고 빈영양상태의 해양조건에서는 미생물 군집 내에서 영양원 흡수 활성을 최대화하기 위한 수송단백질의 높은 발현이 관찰되었다(Table 4).

### 인간의 메타프로테오믹스 연구

Klaassens 등에 의해서 인간의 메타프로테오믹스 분석이 처음으로 이루어졌는데, 신생아 배설물의 단백질은 bead beating (15) 과 분별 원심분리(2, 36) 방법으로 추출되었으며, gel-based 방법으로 분석되었다(Tables 1 and 2). 신생아의 배설물로부터 메타프로테오믹스 분석결과, 장내 미생물인 bifidobacteria가 급속히 증가하여 8일과 117일에 각각 45%와 63%까지 우점하는 것으로 밝혀졌으며, *Bifidobacterium infantis*와 *B. longum*의 인산 오탄당 대사 경로에 관여하는 transaldolase가 가장 높게 발현되는 것으로 나타났다(15). Verberkmoes 등은 성인 배설물로부터 메타프로테오믹스의 50% 이상이 단백질 번역, 에너지생산, 탄수화물 대사에 관여하는 미생물 유래 단백질임을 밝혀냈고, 30% 이상이 인간 면역반응에 관련된 항균 펩타이드, scavenger receptor cycteine-rich (SRCR) 단백질, 염증반응 등에 관여하는 인간 유래의 단백질임을 밝혀냈다(Table 4).

### 토양의 메타프로테오믹스 연구

토양에서 단백질을 추출하는데 있어서 가장 주의해야 할 점은 부식산을 비롯한 유기물과 무기물의 효율적인 제거법에 있다(3, 27). 추출 방법에 대한 여러 가지 연구 예를 보면, 토양으로부터 수용성 단백질의 추출, 비등법과 freeze-thaw, bead beating 방법이 있다. 불순물을 제거하기 위해 SDS, phenol 추출 또는 컬럼을 사용하기도 한다(6, 19, 27, 29, 32).

토양 단백질은 그 양이 적고, 불순물이 많아서 분석에 상당한 어려움이 있다. Chen 등은 균근균이 대량으로 생산하는 당 단백질 glomalin을 검출하기 위해서 immunoblotting 방법을 사용하였다(6). 중금속 오염지에서 채취한 애기장대 (*Arabidopsis halleri*)의 중금속에 대한 적응은 식물과 근권미생물 군집과의 상호관계에 의한 방어시스템 및 광합성 관련 단백질이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Table 4).

### 활성슬러지의 메타프로테오믹스 연구

Wilmes 등은 회분식 활성슬러지 반응기로부터 메타프로테오믹스의 추출 및 동정 과정을 통하여 인 제거 공정의 전체 대사경로를 제안하였다(39, 41, 43). 이들은 또한 메타프로테오믹스 방법을 통해 인 제거에 관여하는 단백질의 변이체가 탈질화, 지방산 순환, 글리옥실산 전환 경로에도 관여한다는 사실을 규명하였다(38).

회분식 활성슬러지 반응기로부터 단백질체의 추출을 위하여 여러가지 방법들이 시도되었고, 각 과정 별 방법은 Table 1에 요약하였다. 메타프로테오믹스 기술의 도입으로 활성슬러지에 의한 생물학적 하수처리 공정 중 인 제거 공정 시에 존재하는 메타프로테오믹스에 대한 검출과 분석이 가능해짐으로써 생물학적 인 제거에 관여하는 미생물의 생애가 밝혀지고, 이 프로테오믹스에 대한 해석을 통하여 인 제거 공정에 대한 심층적인 이해가 가능하게 되었다(Table 4).

### 생물막의 메타프로테오믹스 연구

캘리포니아 Richmond 탄광의 폐수에서 채취된 산성 광산 폐수(acid mine drainage) 생물막은 pH 0.8 이하의 철과 저농

**Table 2.** Summary of isolation, purification, and identification methods/ techniques used in various metaproteome

Sources	Isolation (separation) and identification methodology/techniques	References
<b>Marine</b>		
Seawater (the Gulf of Mexico)	Detergent (0.01% SDS), gel-based: 1-D PAGE and 1-D-LC-MS/MS. Gel-free: 1-D and 2-D-LC-MS/MS. CID spectra. Databases searching with Sequest. <i>de novo</i> sequencing and sequence Tag search. (peptides and proteins identification)	(24)
Seawater (Chesapeake Bay)	Gel-based: 1-D, 2-D PAGE and MALDI-TOF or LC-MS/MS. MALDI and MS/MS spectra. Databases searching with Mascot. <i>de novo</i> sequencing and sequence databases searching with MS-BLAST (NCBI, peptides and proteins identification).	(14)
Seawater (5 miles offshore Newport, Oregon)	Detergent (dodecyl maltoside), gel-based: 1-D PAGE, MALDI-MS and tandem MS. Databases searching with Mascot.	(9)
Seawater (Sargasso sea)	Sample cleanup [using C18 solid phase extraction (SPE) column or a strong cation exchange (SCX) SPE column] and SCX sample fractionation. Gel-free: LC-MS/MS. MS/MS spectra. Databases searching with Sequest.	(31)
<b>Human</b>		
Fecal microbiota (Infant gastrointestinal tract)	Gel-based: 2-D PAGE and MALDI-TOF (MS). Databases searching with BLASTP (NCBI). <i>de novo</i> sequencing and sequence Tag search	(15)
Fecal microbiota (Gut)	Gel-free: a non-targeted, shotgun mass spectrometry-based whole community proteomics, or metaproteomics (2-D-LC-MS/MS). MS/MS spectra. Databases searching with Sequest.	(36)
<b>Soil</b>		
Rhizosphere ( <i>Arabidopsis halleri</i> )	Cysteine reduction and alkylation, gel-based: 2-D PAGE and nanoflow HPLC ESI-Q-TOF MS. Gel analysis (PDQuest software v7.3.0, BioRad)	(8)
Contaminated soil groundwater (Chlorobenzene)	Gel based: 1-D, 2-D PAGE and 2-D-nano LC (reversed phase, RP)-MS/MS. Database searching with Mascot against NCBI or Spectrum Mill	(3)
Sediments (Coal hydro- genation and benzene plant)	Gel based: 1-D, 2-D PAGE and nano-LC (RP)-ESI-MS, LTQ Orbitrap XL, Database searching with Mascot.	(4)
Agriculture soil	Gel based: 1-D, 2-D PAGE and immunoblotting	(6)
Soil sediment, Wastewater	PAGE, fingerprint analysis	(19, 32)
Soil water, Lake water	Gel based: 1-D PAGE, hybrid Qstar XL MS, database searching with Mascot.	(29)
<b>Activated sludge</b>		
Anaerobic sludge granules	Sample cleanup (2-D clean up kit), 2-D PAGE, gel analysis (PDQuest-Advanced software v8.0.1)	(1)
Waste activated sludge	Gel-based: 1-D PAGE and LC-MS/MS. MS/MS spectra. Databases searching with Mascot.	(21)
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Gel-based: 2-D PAGE and MALDI-MS. MS/MS spectra. Databases searching with BioTools v3.0 and Mascot.	(12)
Complex activated sludge community	Gel-free: 2-D LC (SCX-RP)-MS/MS. MS/MS spectra. Databases searching with Sequest.	(36)
Activated sludge from lab-scale SBR	Gel-based: 2-D PAGE, MALDI-ToF MS and Q-ToF MS/MS. MS/MS spectra. Databases searching with Mascot.	(43)
Activated sludge from lab-scale SBR	2-D PAGE, gel analysis (PDQuest software v7.3.0)	(41)
Activated sludge from lab-scale SBR	Gel-based: 2-D PAGE, MALDI-ToF MS and Q-ToF MS/MS. MS/MS spectra. Databases searching with Mascot. <i>de novo</i> sequencing and sequence databases searching with BLASTP.	(39)
<b>Wastewater</b>		
Microbial community in a continuous-flow wastewater treatment bioreactor	Gel-based: 2-D PAGE, MALDI-TOF-TOF MS/MS. MS/MS spectra. Databases searching with Mascot. <i>de novo</i> sequencing and sequence databases searching with MS-BLAST.	(16)
<b>Freshwater</b>		
Natural freshwater samples	1-D PAGE, fingerprint analysis	(22)
<b>Biofilm</b>		
Microbial biofilm (The Richmond mine at Iron Mountain, near Redding, California)	Gel-free: using genomic and shotgun mass spectrometry (MS)-based proteomic methods (2D-nano-LC MS/MS). MS/MS spectra. Databases searching with BLASTP.	(25)

**Table 3.** Databases for peptide mass fingerprinting and protein identification

Databases	Website	References
ExPASy	<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>	Mirror Sites (Australia, Brazil, Canada, China, Korea)
PIR-PSD	<a href="http://pir.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/pir_psd.shtml">http://pir.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/pir_psd.shtml</a>	Protein Information Resource
PIR-NREF	<a href="http://pir.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/nref.shtml">http://pir.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/nref.shtml</a>	PIR-PSD, SwissProt, TrEMBL, RefSeq, GenPept, and PDB
UniProt	<a href="http://www.uniprot.org/">www.uniprot.org/</a>	Swiss-Prot, TrEMBL, and PIR-PSD
IPI (International Protein Index)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html">http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html</a>	UniProt, RefSeq, and Ensembl
NCBI (National Center for Bioinformation Technology)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> <a href="http://www.ionsource.com/">http://www.ionsource.com/</a>	SwissProt, PIR, PRF, PDB, and translations from annotated coding regions in GenBank and RefSeq. MS-BLAST, BLASTP
MS-Fit	<a href="http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm">http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm</a>	University of California, San Francisco (USA)
Mascot	<a href="http://www.matrixscience.com/search_form_select.html">http://www.matrixscience.com/search_form_select.html</a>	matrixscience
Peptident	<a href="http://us.expasy.org/tools/peptident.html">http://us.expasy.org/tools/peptident.html</a>	Expasy
ProFound	<a href="http://www.unb.br/cbsp/paginiciais/profound.html">http://www.unb.br/cbsp/paginiciais/profound.html</a>	The Rockefeller University
MassSearch	<a href="http://mendel.ethz.ch:8080/Server/ServerBooklet/MassSearchEx.html">http://mendel.ethz.ch:8080/Server/ServerBooklet/MassSearchEx.html</a>	CBRG (Computational Biochemistry Research Group)
PeptideSearch	<a href="http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html">http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html</a>	Bioanalytical Research Group (Germany)
PFAM	<a href="http://pfam.sanger.ac.uk/">http://pfam.sanger.ac.uk/</a>	Collection of protein families using multiple sequence alignments and hidden Markov models
Phylofacts	<a href="http://phylogenomics.berkeley.edu/phylofacts/index.php">http://phylogenomics.berkeley.edu/phylofacts/index.php</a>	Structural phylogenomic encyclopedia for protein functional and structural classification
MEGAN	<a href="http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/megan/">http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/megan/</a>	Metagenome Analysis Software
Metagenomics RAST server	<a href="http://metagenomics.nmpdr.org/">http://metagenomics.nmpdr.org/</a>	Automated metagenome analysis using SEED environment
CAMERA	<a href="http://camera.calit2.net">http://camera.calit2.net</a>	Data repository and bioinformatics tools resource
Integrated microbial genomes with microbiome samples (IMG/M)	<a href="http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi">http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi</a>	Comparative metagenome analysis and annotation tools
Human oral microbiome database	<a href="http://www.homd.org/">http://www.homd.org/</a>	Database on bacteria from the human oral cavity
SEED	<a href="http://www.theseed.org/wiki/index.php/Home_of_the_SEED">http://www.theseed.org/wiki/index.php/Home_of_the_SEED</a>	Comparative genomics environment
Sequest	<a href="http://fields.scripps.edu/sequest/">http://fields.scripps.edu/sequest/</a>	Tandem mass spectrometry data analysis program

도의 아연, 구리 그리고 비소가 포함된 수용액에서 형성된다. 이와 같이 극한조건에서 생성된 생물막은 shot-gun 방법을 통하여 메타프로테오믹스 분석되었다(18, 25). 펩타이드 혼합물을 2-D-LC-MS/MS로 분석하여 Sequest 프로그램 등을 사용하여 단백질을 동정하였다(Table 2). 메타프로테오믹스 분석 결과, 5종의 미생물 우점종과 2033종의 단백질을 동정할 수 있었다. 동정된 단백질들은 산화적 스트레스와 단백질 refolding에 관여하는 단백질들로 극한 환경에서 생존 및 적응하기 위한 단백질들의 발현이 높게 나타났다(Table 4).

## 그 외의 연구

Pierre-Alain 등은 인위적으로 카드뮴과 수은에 오염시킨 담수로부터 최적의 미생물 메타프로테오믹스 추출 방법을 소개하고,

단백질 fingerprinting 방법의 유용성을 제시하였다(Tables 1 and 2). Lacerda 등은 연속 흐름식 하수처리 반응기에서 배양시킨 미생물에 카드뮴 처리 시, 해독을 위한 배출 메커니즘에 관여하는 ATPases, oxidoreductases, 수송단백질이 발현되었음을 밝혀냈다(16).

이러한 메타프로테오믹스 기술은 미생물 생태계 내에서의 미생물 군집과 환경인자에 의한 단백질의 발현양상에 대한 일련의 메커니즘을 규명하는데 기여할 것이다.

## 결론

메타프로테오믹스(metaproteomics)는 환경미생물 연구에 있어서 엄청난 잠재력을 가진 획기적인 연구 방향을 제안한다.

**Table 4.** Results of metaproteomics studies in environmental samples

Environmental samples	Sources	Results
Marine	Seawater (Sargasso sea; 31)	This analysis of ocean communities indicates that a large proportion detected were periplasmic substrate-binding proteins, providing insight into marine ecosystem function.
Human	Fecal microbiota (Gut; 36)	The majority of detected proteins were involved in translation, carbohydrate metabolism, or energy production; together representing more than 50% of the total proteins in the metaproteome. Human proteins, including antimicrobial peptides, were also identified, providing a non-targeted glimpse of the host response to the microbiota.
Soil	Rhizosphere ( <i>Arabidopsis halleri</i> shoots; 8)	Differences in protein expression pattern indicated a general upregulation of photosynthesis-related proteins in plants exposed to metals and to metals plus microorganisms.
Sludge	Activated sludge from lab-scale (SBR, Norwich, UK; 39)	This community proteomic investigation was first applied to a lab-scale activated sludge reactor and led to further studies on a variety of different environmental samples.
Biofilm	Microbial biofilm (Richmond mine at Iron Mountain, near Redding, California; 25)	This comprehensive community proteomic investigation obtained high coverage of proteins from the dominant organism (identify 2033 individual proteins of five abundant species) and led to a number of subsequent fruitful studies of acid mine drainage (AMD) biofilms.

물론 밝혀지지 않은 신규 단백질의 기능을 밝혀야 하는 난제도 있지만, 환경 프로테오믹스 내에서 높게 발현되는 제한된 수의 단백질 분석에 집중해서 연구해나감으로써 새로운 메타프로테오믹스 분야의 발전에 대한 잠재력은 더욱 광범위해질 것으로 예상된다. 또한 메타지노믹스(metagenomics), 메타트랜스크립토믹스(metatranscriptomics), 메타볼로믹스(metametabolomics)와 더불어 메타프로테오믹스는 미생물 군집구조, 기능, 생리학, 상호관계, 생태학, 진화 사이에 보다 광범위한 정보를 수집할 수 있게 하는 아주 정밀한 분자생물학적 데이터를 제공한다.

특히 메타지노믹스 연구에서 밝혀지지 않은 기능에 대해서도 메타프로테오믹스 분석을 수행함으로써 발현 유전자에 대해서 밝혀낼 수 있을 것이다. 그러므로 미생물 생태계에 있어서 단백질의 추출, 분리와 분석기술의 개발, 그리고 데이터의 대량분석 기술의 발전과 더불어 메타프로테오믹스의 빠른 발전이 예상된다.

## 적용

미생물 군집과 기능연구를 위한 최근의 새로운 분석기술의 발전은 다양한 유전 관련 정보를 제공해왔다. mRNA를 포함하는 핵산을 기초로 한 연구를 뛰어넘어서 메타프로테오믹스는 미생물 군집의 유전형 및 표현형의 특징적인 정보를 보다 정교하게 제공할 수 있다. 이미 서로 다른 미생물 생태계인 해수, 인간의 배설물, 활성 슬러지, 산성 광산 폐수 생물막, 토양 등에 메타프로테오믹스 기술이 유용하게 사용되었다. 이들 연구는 여러 측면에서 상당히 다르지만 미생물 군집의 구조, 기능, 생리, 상호관계, 생태, 진화적 측면을 결정적으로 상호 연결한다는 것을 밝혀냈다. 본 총설은 메타프로테오믹스에 대한 현재까지의 가장 최신의 정보를 요약하여 제공함으로써 메타프로테오믹스에 대한 정확한 이해와 활용을 통해 다방면의 메타프로테오믹스가 가능하도록 하고자 하였다.

## 감사의 말

본 논문은 경상북도 울진군의 연구비 지원사업(P-15-3401)과 국토해양부 해양 극한생물분자유전체 연구단 사업의 지원으로 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. Abram, F., E. Gunnigle, and V. O'Flaherty. 2009. Optimisation of protein extraction and 2-DE for metaproteomics of microbial communities from anaerobic wastewater treatment biofilms. *Electrophoresis* 30, 4149-4151.
2. Apajalahti, J.H.A., A. Kettunen, M.R. Bedford, and W.E. Holben. 2001. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5656-5667.
3. Benndorf, D., G.U. Balcke, H. Harms, and M. von Bergen. 2007. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME J.* 1, 224-234.
4. Benndorf, D., C. Vogt, N. Jehmlich, Y. Schmidt, H. Thomas, G. Woffendin, A. Shevchenko, H.H. Richnow, and M. von Bergen. 2009. Improving protein extraction and separation methods for investigating the metaproteome of anaerobic benzene communities within sediments. *Biodegradation* 20, 737-750.
5. Cardenas, E. and J.M. Tiedje. 2008. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 544-549.
6. Chen, S., M.C. Rillig, and W. Wang. 2009. Improving soil protein extraction for metaproteome analysis and glomalin-related soil protein detection. *Proteomics* 9, 4970-4973.
7. Desai, C., H. Pathak, and D. Madamwar. 2010. Advances in molecular and "-omics" technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 101, 1558-1569.
8. Farinati, S., G. DalCorso, E. Bona, M. Corbella, S. Lampis, D. Cecconi, R. Polati, and et al. 2009. Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics* 9,

- 4837-4850.
9. Giovannoni, S.J., L. Bibbs, J.C. Cho, M.D. Stappels, R. Desiderio, K.L. Vergin, M.S. Rappe, and *et al.* 2005. Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. *Nature* 438, 82-85.
  10. Graham, R.L.J., C. Graham, and G. McMullan. 2007. Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microb. Cell Fact.* 6, 26.
  11. Graves, P.R. and T.A.J. Haystead. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 39-63.
  12. Jehmlich, N., F. Schmidt, M. von Bergen, H.H. Richnow, and C. Vogt. 2008. Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *ISME J.* 2, 1122-1133.
  13. Jerez, C.A. 2007. Proteomics and metaproteomics applied to biomining microorganisms, pp. 241-251. In E. Donati and W. Sand (ed.), *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Springer, Germany.
  14. Kan, J., T.E. Hanson, J.M. Ginter, K. Wang, and F. Chen. 2005. Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. *Saline Syst.* 1, 7.
  15. Klaassens, E.S., W.M. de Vos, and E.E. Vaughan. 2007. Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1388-1392.
  16. Lacerda, C.M., L.H. Choe, and K.F. Reardon. 2007. Metaproteomic analysis of a bacterial community response to cadmium exposure. *J. Proteome Res.* 6, 1145-1152.
  17. Lacerda, C.M.R. and K.F. Reardon. 2009. Environmental proteomics: applications of proteome profiling in environmental microbiology and biotechnology. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* 8, 75-87.
  18. Lo, I., V.J. Denef, N.C. Verberkmoes, M.B. Shah, D. Goltsman, G. DiBartolo, G.W. Tyson, and *et al.* 2007. Strain-resolved community proteomics reveals recombining genomes of acidophilic bacteria. *Nature* 446, 537-541.
  19. Ogunseitan, O.A. 1993. Direct extraction of proteins from environmental samples. *J. Microbiol. Methods* 17, 273-281.
  20. Ogunseitan, O.A. 1997. Direct extraction of catalytic proteins from natural microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 28, 55-63.
  21. Park, C. and R.F. Helm. 2008. Application of metaproteomic analysis for studying extracellular polymeric substances (EPS) in activated sludge flocs and their fate in sludge digestion. *Water Sci. Technol.* 57, 2009-2015.
  22. Pierre-Alain, M., M. Christophe, S. Severine, A. Houria, L. Philippe, and R. Lionel. 2007. Protein extraction and fingerprinting optimization of bacterial communities in natural environment. *Microb. Ecol.* 53, 426-434.
  23. Pierre-Alain, M., R. Lionel, M. Christophe, and L. Philippe. 2007. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. *Microb. Ecol.* 53, 486-493.
  24. Powell, M.J., J.N. Sutton, C.E. Del Castillo, and A.T. Timperman. 2005. Marine proteomics: generation of sequence tags for dissolved proteins in seawater using tandem mass spectrometry. *Marine Chemistry* 95, 183-198.
  25. Ram, R.J., N.C. Verberkmoes, M.P. Thelen, G.W. Tyson, B.J. Baker, R.C. Blake II, M. Shah, and *et al.* 2005. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* 308, 1915-1920.
  26. Rappe, M.S., S.A. Connon, K.L. Vergin, and S.J. Giovannoni. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418, 630-633.
  27. Schulze, W.X., G. Gleixner, K. Kaiser, G. Guggenberger, M. Mann, and E.D. Schulze. 2005. A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles. *Oecologia* 142, 335-343.
  28. Schweder, T., S. Markert, and M. Hecker. 2008. Proteomics of marine bacteria. *Electrophoresis* 29, 2603-2616.
  29. Solaiman, Z., M.A. Kashem, and I. Matsumoto. 2007. Environmental proteomics: extraction and identification of protein in soil, pp. 155-166. In A. Varma and R. Oelmuller (eds.), *Advanced techniques in soil microbiology*. Soil Biology, vol 8, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
  30. Sowell, S.M., A.D. Norbeck, M.S. Lipton, C.D. Nicora, S.J. Callister, R.D. Smith, D.F. Barofsky, and S.J. Giovannoni. 2008. Proteomic analysis of stationary phase in the marine bacterium "*Candidatus Pelagibacter ubique*". *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4091-4100.
  31. Sowell, S.M., L.J. Wilhelm, A. D. Norbeck, M.S. Lipton, C.D. Nicora, D.F. Barofsky, C.A. Carlson, R.D. Smith, and S.J. Giovannoni. 2009. Transport functions dominate the SAR11 metaproteome at low-nutrient extremes in the Sargasso Sea. *ISME J.* 3, 93-105.
  32. Taylor, E.B. and M.A. Williams. 2010. Microbial protein in soil: influence of extraction method and C amendment on extraction and recovery. *Microb. Ecol.* 59, 390-399.
  33. Tyson, G.W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E.E. Allen, R.J. Ram, P.M. Richardson, V.V. Solovyev, and *et al.* 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428, 37-43.
  34. Valenzuela, L., A. Chi, S. Beard, A. Orell, N. Guiliani, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and C.A. Jerez. 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 24, 197-211.
  35. Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D. Wu, and *et al.* 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66-74.
  36. Verberkmoes, N.C., A.L. Russell, M. Shah, A. Godzik, M. Rosenquist, J. Halfvarson, M.G. Lefsrud, and *et al.* 2009. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME J.* 3, 179-189.
  37. Wilhelm, L.J., H.J. Tripp, S.A. Givan, D.P. Smith, and S.J. Giovannoni. 2007. Natural variation in SAR11 marine bacterioplankton genomes inferred from metagenomic data. *Biol. Direct* 2, 27.
  38. Wilmes, P., A.F. Andersson, M.G. Lefsrud, M. Wexler, M. Shah, B. Zhang, R.L. Hettich, and *et al.* 2008. Community proteogenomics highlights microbial strain-variant protein expression within activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *ISME J.* 2, 853-864.
  39. Wilmes, P. and P.L. Bond. 2004. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environ. Microbiol.* 6, 911-920.
  40. Wilmes, P. and P.L. Bond. 2006. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol.* 14, 92-97.
  41. Wilmes, P. and P.L. Bond. 2006. Towards exposure of elusive metabolic mixed-culture processes: the application of metaproteomic analyses to activated sludge. *Water Sci. Technol.* 54, 217-226.
  42. Wilmes, P. and P.L. Bond. 2009. Microbial community proteomics: elucidating the catalysts and metabolic mechanisms that drive the Earth's biogeochemical cycles. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 310-317.
  43. Wilmes, P., M. Wexler, and P.L. Bond. 2008. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment. *PLoS ONE* 3, e1778.
  44. Zhao, B. and C.L. Poh. 2008. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics* 8, 874-881.