

Mass Spectrometry-based Comparative Analysis of Membrane Protein: High-speed Centrifuge Method Versus Reagent-based Method

Jiyeong Lee¹, Ae Eun Seok¹, Arum Park¹, Sora Mun², Hee-Gyoo Kang^{1,2}¹Department of Biomedical Laboratory Science, Eulji University, Seongnam, Korea²Department of Senior Healthcare, BK21 Plus Program, Graduate School, Eulji University, Seongnam, Korea

질량분석기를 활용한 막 단백질 비교분석: High-speed Centrifuge법과 Reagent-based법

이지영¹, 석애은¹, 박아름¹, 문소라², 강희규^{1,2}¹울지대학교 보건과학대학 임상병리학과, ²울지대학교 일반대학원 시니어헬스케어학과

Membrane proteins are involved in many common diseases, including heart disease and cancer. In various disease states, such as cancer, abnormal signaling pathways that are related to the membrane proteins cause the cells to divide out of control and the expression of membrane proteins can be altered. Membrane proteins have the hydrophobic environment of a lipid bilayer, which makes an analysis of the membrane proteins notoriously difficult. Therefore, this study evaluated the efficacy of two different methods for optimal membrane protein extraction. High-speed centrifuge and reagent-based method with a +/- filter aided sample preparation (FASP) were compared. As a result, the high-speed centrifuge method is quite effective in analyzing the mitochondrial inner membranes, while the reagent-based method is useful for endoplasmic reticulum membrane analysis. In addition, the function of the membrane proteins extracted from the two methods were analyzed using GeneGo software. GO processes showed that the endoplasmic reticulum-related responses had higher significance in the reagent-based method. An analysis of the process networks showed that one cluster in the high-speed centrifuge method and four clusters in the reagent-based method were visualized. In conclusion, the two methods are useful for the analysis of different subcellular membrane proteins, and are expected to assist in selecting the membrane protein extraction method by considering the target subcellular membrane proteins for study.

Key words: High-speed centrifuge method, Membrane protein, Membrane protein extraction, Reagent-based method

Corresponding author: Hee-Gyoo Kang
Department of Biomedical Laboratory Science,
College of Health Sciences, Eulji University, 553
Sanseong-daero, Sujeong-gu, Seongnam
13135, Korea
Tel: 82-31-740-7315
E-mail: kanghg@eulji.ac.kr
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8690-2483>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: November 17, 2018
Revised 1st: February 11, 2019
Revised 2nd: February 15, 2019
Accepted: February 18, 2019

서론

세포막은 모든 세포의 구성성분으로써, 세포의 외부와 내부를 구분하고, 신호전달, 세포와 세포의 연결, 세포의 물질이동

및 효소의 작용에 중요한 역할을 한다[1]. 막 단백질은 세포막 전체 질량의 약 50%를 차지하며 단백질의 양과 종류는 세포마다 조금씩 차이가 있다[2]. 막 단백질의 종류는 크게 세가지로 분류할 수 있다. 내재성 막 단백질(integral membrane protein), 외

재성(표재성) 막 단백질(peripheral protein), 고정 막 단백질(anchored membrane protein)이 해당된다. 내재성 막 단백질은 인지질 이중층 사이에 한 가닥 또는 다수의 가닥으로 존재하여 소수성(hydrophobic) 성질을 가지고, 외재성 막 단백질은 소수성인 세포막과 직접적으로 연결되지 않기 때문에 부분적으로만 소수성을 가진다. 마지막으로, 고정 막 단백질의 경우 지질 이중층과 접촉하지는 않지만 이중층에 공유 결합된 지질기를 고정하여 막의 양측에 부착된다.

세포막 단백질체학(membrane proteomics)은 정상 또는 비정상 세포에 존재하는 전체적인 막 단백질을 분석하는 학문이라고 정의할 수 있다[3-5]. 세포막 단백질체학에 관한 연구로는 질병 조기 진단을 위한 진단 생체표지자 발굴 및 치료 적용을 위한 약물 표적연구 등이 연구되고 있으며, 최근에는 암 전이 인자를 세포막 단백질체학을 통해 발굴하는 연구가 활발히 진행 중이다[4, 6-8]. 전이성 암의 특징으로는 세포의 증식, 세포와 세포의 결합, 그리고 암세포의 이동이 있으며 세포막 단백질은 이들 특징에 관여한다[9, 10].

막 단백질 연구에 중요성이 높아지면서 큰 규모의 액체크로마토그래피-탠덤질량분석기(liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS)를 활용하는 방법은 막 단백질 연구에 많은 도움을 주었다[11, 12]. 실제로, Liu (2010)은 전이성 췌장암세포와 비전이성 췌장암세포의 막 단백질 발현 차이를 통해 막 단백질이 췌장암 진단 생체 표지자로 활용될 수 있음을 보고하였으며[3], 전이성 유방암세포와 비전이성 유방암세포의 막 단백질 분석을 토대로 세포결합에 관여하는 막 단백질 integrins, ICAM-1 (CD54), CD44, MUC18 (CD146)의 발현에 차이가 있는 것을 증명하였다[3, 10]. 이처럼, 질량분석기는 단백질을 연구하는데, 유용한 도구이다. 앞서 소개한 바이오마커 연구를 위한, 단백질 정성 및 정량, 뿐만 아니라 단백질 변형을 확인하는 연구, 단백질 구조 연구, 신호전달 연구도 가능하다[12, 13]. 하지만, 막 단백질을 연구하는데 있어서, 세포질 내 단백질을 연구하는 것과는 달리 몇가지 어려움이 존재한다[14]. 왜냐하면, 막 단백질은 소수성의 성질을 가지기 때문에, 세포 내에서 막 단백질을 분리 정제하는 것에 어려움이 있기 때문에, 세포질 단백질로부터 순수한 막 단백질만을 추출해 내는 것이 중요하다[14].

LC-MS/MS를 이용하여 막 단백질을 동정하기 위해서는 세포 내에 존재하는 순수 세포막 단백질을 추출하는 것이 중요하다[15]. 하지만, 막 단백질은 생체 내 적은 양 존재하고 소수성 성질을 가지기 때문에 추출에 어려움이 있다. 이러한 문제점 극복하기 위해서는 LC-MS/MS분석 전에, 막 단백질 샘플 전 처리

에 해당되는 농축(enrichment), 가용화(solubilization), 단백질 분해(digestion) 그리고 분획 분류(fractionation)과정이 더 세심하게 진행되어야 하는 노력이 필요하다[11, 16]. 따라서, 본 연구에서는 막 단백질의 효율적 동정을 위해 가장 빈도 높게 사용되고 있는 high-speed centrifuge를 이용한 방법과, chemical reagent를 이용한 방법 두 가지를 비교하였다. 첫 번째 방법은 동결 및 해동 방법으로 세포를 용해하여 high-speed centrifuge로 막 단백질을 추출하는 방법이며, 두 번째 방법은 chemical reagent를 통해서 세포막을 가용화시켜 막 단백질을 추출하는 방법이다. Chemical reagent를 이용한 방법에는 상용화된 키트가 사용되었다. 연구에 사용된 질량분석기는 고 해상도 액체크로마토그래프의 한 종류인 Nano-Chip-LC/QTOF-MS를 사용하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

사람 전립선 암 세포 주인 Du145 (안드로젠 비 의존성) 74번째 계대 배양하였으며, T-75 플라스크에 10% 소태아혈청(Fetal bovine serum, FBS), 100 µg/mL penicillin, 그리고 100 µg/mL streptomycin이 함유된 RPMI1640 배지에 5% CO₂와 37°C 환경에서 배양되었다. 세포 계대 및 수확 단계는 0.25% trypsin/EDTA를 사용하였으며, high-speed centrifuge방법의 경우 참고 논문에서 명시된 1×10⁷ 세포를, reagent-based 방법의 경우 키트에 명시된 5×10⁶ 세포 수를 측정하여 준비하였다.

2. 막 단백질 추출

수확한 세포로부터 막 단백질 농축을 위해 두 가지 방법을 사용하였다. 첫 번째 high-speed centrifuge방법은 high-speed centrifuge를 사용한 보고에서 제시된 막 단백질 농축법대로 [17] 1×10⁷ 세포를 모은 후 200 ×g에서 2분 동안 원심분리한 후 침전된 세포에 500 µL 증류수를 첨가하고 충분히 섞어 준 후 얼음 위에서 10분간 유지한다. 그 후, 액화질소에서 1분간 얼린 후, 실온에서 녹이는 과정을 두 번 반복하고 4°C에서 100,000 ×g에서 20분 동안 원심분리 후, 상층액을 제거하는 과정을 3번 반복한다. 마지막으로 상층액을 제거한 후 남은 침전물에 7 M urea/2 M thiourea (lysis buffer)를 첨가하였다[17]. 두 번째 방법으로는 reagent-based 방법을 적용하기 위해서, 상용화된 Membrane Protein Extraction Kit (Thermo, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. 본 키트에서 제시하는 진행과정에 따라 막

단백질을 수확하였다. 간략하게 설명하면, 5×10^6 세포를 모은 후, $300 \times g$ 에서 5분 동안 원심분리 하였다. 3 mL의 cell wash solution으로 세척한 후 $300 \times g$ 에서 5분 동안 원심분리 한 후, 상층액을 제거하였다. 세포를 1.5 mL cell wash solution으로 풀어 준비한 후, 2 mL 튜브로 옮겨서 $300 \times g$ 에서 5분간 원심분리 하한 후에 상층액을 제거하였다. 그 후 0.75 mL permeabilization buffer를 세포에 첨가하여, 세포가 buffer에 작용하도록 잘 섞어주었다. 10분동안 $4^\circ C$ 에서 믹싱한 후에, 세포를 15분동안 $16,000 \times g$ 에서 원심분리하였다. 이때, 세포질 단백질이 포함된 상층액은 따서, 새로운 튜브에 옮겨 담았으며, 세포 덩어리에는 0.5 mL의 solubilization buffer를 넣고, 잘 섞어준 후, $4^\circ C$ 에서 30분 동안 혼합하였다. 그 후 $16,000 \times g$ 에서 15분 동안, $4^\circ C$ 에서 원심분리하였다. 이때, 얻어진 상층액은 막 단백질을 포함하는 것으로, 분석전까지 $-80^\circ C$ 에서 보관하였다.

3. Nano-Chip-LC/QTOF-MS를 위한 tryptic 단백질 분해

수확된 막 단백질에 5 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) (Pierce, Rockford, IL, USA)를 처리하여 단백질 환원을 유도한 후, $37^\circ C$, 300 rpm에서 30분간 교반하였다. Reagent-based 방법의 경우 추가적으로 filter aided sample preparation (FASP)과정이 추가되는데 이는 계면활성제(detergent)를 제거하기 위한 과정으로 필터 튜브(Microcon, Millipore Corp, Bedford, MA)를 이용하여 진행하였다. 단백질 환원 후에 15 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μL 를 첨가한 후 $25^\circ C$, 300 rpm에서 1시간 동안 암실에서 교반하였다. 이후 단백질 1 mg 당 trypsin (Promega, Madison, WI, USA) 20 μg 을 처리하여 $37^\circ C$, 300 rpm으로 16시간 유지하였다. 이렇게 처리된 샘플은 C18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 세척 단계를 진행하였다. 이후 샘플은 Speed Vacuum Concentrator (Scanvac, Labogene, Denmark)을 이용하여 완전 동결건조 한 후 10% formic acid를 첨가하여 샘플을 준비하였다.

4. Nano-Chip-LC/QTOF-MS 분석

모든 샘플에 0.1% formic acid 20 μL 첨가하고 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)에 HPLC-chip (large capacity chip, 150 mm, 300 A, C18 chip, 160 nL 농축컬럼) (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)을 사용하였으며 나노 유속(nano-flow) 펌프를 사용하였다. 샘플의 유속은 4 $\mu L/min$ 으로 A 이동상(mobile phase) 용액으로는 0.1% formic acid, B 이동상 용액으로는 90%

acetonitrile/0.1% formic acid를 사용하였고 물은 HPLC 등급을 사용하였다. 이동상 B 용액 10~45%로 순차적으로 35분간 로딩하였고, 90% 이동상 B 용액으로 10분 더 처리하였다. Agilent 6520 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight Liquid chromatography-mass spectrometry (Q-TOF/LC-MS) system (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)에 HPLC-chip cube를 사용하여 질량 분석하였다. 데이터의 질량 범위(mass range)는 양이온을 100~3000 m/z에서 얻었으며, 3.7 V의 충돌에너지(collision energy)를 사용하였다.

5. 단백질 데이터베이스(database) 검색

Tandem mass spectrometry (MS/MS) 스펙트럼은 펩타이드 단편이온(peptide fragment ions)을 단백질의 아미노산 서열로 동정하였다. 데이터베이스 검색은 합리적인 제한적 파라미터를 이용하여 수행하였으며 모든 펩타이드 동정은 Spectrum Mill (B.04.00 version of Agilent) 소프트웨어로 진행하였다. 이때 사용된 데이터베이스는 Universal Protein Resource (UniProt, <http://www.uniprot.org>)을 사용하였고, Spectrum Mill Software에 사용된 false discovery rate (FDR)은 1.2%이며 위양성률은 최소 1%로 진행하였다.

6. 단백질 기능 및 네트워크 분석

단백질들의 네트워크의 시각화를 위한 도구(visualization tool)로는 MetaCore version 6.4 (GeneGo Inc. St. Joseph, MI, USA) (www.genego.com)와 PANDORA 4.2 (<http://www.pandora.cs.huji.ac.il>)를 이용하였다. Pandora 서버에서는 막 단백질 그룹의 세포 구성 요소(cellular component)를 분류하였고, MetaCore 네트워크 분석에 사용된 알고리즘(algorithm)은 일반적인 Shortest path, 유전자 온톨로지(Gene Ontology, GO) process 등을 사용하였다.

결 과

1. 막 단백질 동정

LC-MS/MS 분석 결과 high-speed centrifuge법에서만 동정된 단백질이 113개, reagent법에서만 동정된 단백질이 119개 그리고 양쪽에서 모두 동정된 단백질은 104개 확인되었다 (Figure 1A). 동정된 순수 막 단백질은 high-speed centrifuge법에서 101개로 전체 중에서 47%를 차지하였고, reagent법에서는 79개로 35%가 차지하였다(Figure 1B). 전체적으로 막 단백질은 high-speed centrifuge법에서 약 12% 더 많은 막 단백

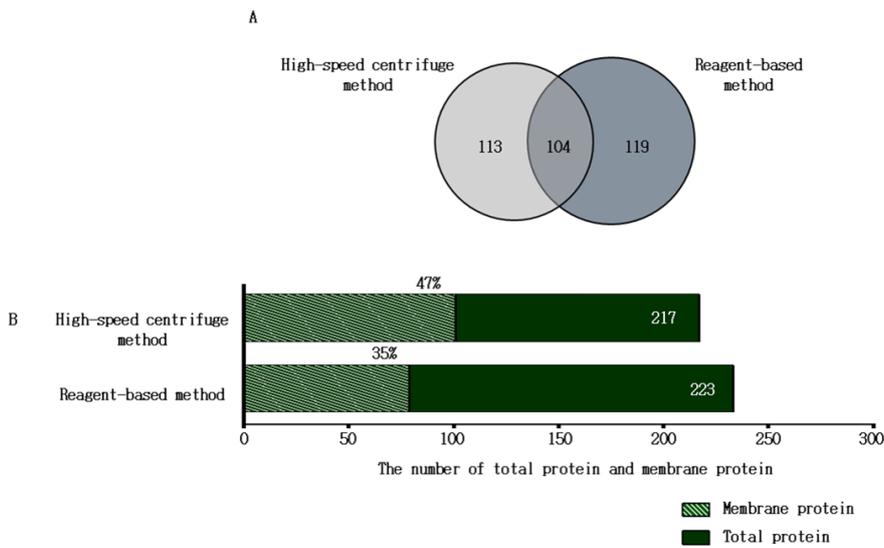


Figure 1. Identified total proteins in high-speed centrifuge and reagent-based method. (A) Venn diagram of identified total proteins in high-speed centrifuge and reagent-based method. (B) The number of membrane protein and total proteins that were identified using Spectrum Mill software. Slash green bar represent the number of membrane protein and green bar represent the total proteins.

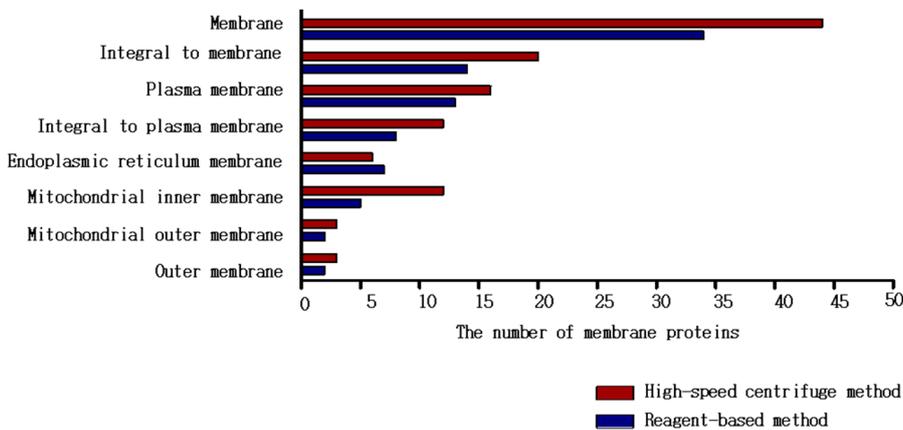


Figure 2. Selection of subcellular localization of identified membrane proteins through Pandora server. Identified membrane proteins were classified as subgroup. Red bar represents the membrane proteins that were extracted using high-speed centrifuge method and blue bar represent the membrane proteins that were extracted using reagent-based method.

질이 동정된 것을 확인함으로써 high-speed centrifuge법이 reagent법에 비해서 추출 효율이 높음을 확인하였다. high-speed centrifuge법과 reagent법의 세포 구성 요소 차이를 분석하기 위해서 Pandora 서버를 이용하여 분석한 결과, high-speed centrifuge법에서 막 단백질이 44개, 내재성 막단백질(integral to membrane)이 20개, 원형질막(plasma membrane)이 16개, 내재성 원형질막(integral to plasma membrane) 12개, 소포체막(endoplasmic reticulum membrane) 6개, 미토콘드리아 내막(mitochondria inner membrane) 12개, 미토콘드리아 외막(mitochondria outer membrane) 3개, 외막 단백질(outer membrane)이 3개로 확인되었다. 반면에 reagent법인 경우 막 단백질이 34개, 내재성 막단백질(integral to membrane)이 14개, 원형질막(plasma membrane)이 13개, 내재성 원형질막(integral to plasma membrane) 8개, 소포체막(endoplasmic reticulum membrane) 7개, 미토콘드리아 내

막(mitochondria inner membrane) 5개, 미토콘드리아 외막(mitochondria outer membrane) 2개, 외막 단백질(outer membrane)이 2개로 확인되었다(Figure 2). 하위 막단백질 분류에서도 high-speed centrifuge법이 reagent법 보다 분류 효율이 높은 것을 확인할 수 있었다. 각 방법론에서 추출된 막단백질 리스트를 비교 분석한 결과, 미토콘드리아 내막 단백질의 경우 reagent법에서 동정된 막단백질은 모두가 high-speed centrifuge법에서도 동일하게 동정할 수 있었으나, high-speed centrifuge법에서 동정된 8개의 막 단백질의 경우는 reagent법에서 동정되지 않았다. High-speed centrifuge법에서 동정된 8개의 단백질은 ATP synthase O subunit, mitochondrial precursor, NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial precursor, prohibitin-2, prohibitin, ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein I, ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein, succinate dehydro-

genase [ubiquinone] flavoprotein subunit, import inner membrane translocase subunit TIM50이고, 두 가지 방법론에서 모두 동정된 단백질 4개는 ADP/ATP translocase 3, adenine nucleotide translocator 2, ATP synthase alpha chain, ATP synthase beta chain, phosphate carrier protein이다. 반면에, 소포체 막 단백질에서는 high-speed centrifuge법에서 동정된 막단백질은 모두가 reagent법에서도 동일하게 동정할 수 있었으나, reagent법에서 동정된 5개의 막단백질의 경우는 high-speed centrifuge법에서 동정되지 않았다(Figure 3). 두 가지 방법론에서 모두 동정된 단백질 2개는 ribophorin I, ribophorin II이고, reagent-based method법에서만 동정된 5개의 단백질은 aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase, oligosaccharyl transferase 48 kDa subunit thioredoxin, main-containing protein 1 precursor, reticulon-4, neurite outgrowth inhibitor, translocon-associated protein delta subunit precursor이다. 이를 통해서 미토콘드리아 내막 단백질을 분석하고자 할 때에는 high-speed centrifuge법을 사용하는 것이 유용하고, 소포체 막단백질을 분석하고자 할 때에는 reagent법을 사용하는 것이 유용함을 확인하였다.

2. 전체 막단백질 기능분석

본 연구는 동정된 단백질들의 기능분석을 위해 MetaCore 6.4 소프트웨어를 사용하였다. 벤 다이어그램의 결과 중 high-speed centrifuge법에서 동정된 217개와 reagent법에서 동정된 223개의 단백질을 분석하였다. GO process 분석 결과 10개의 기능들 중에서 SRP 의존 공 번역(SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane), 소포체로의 단백

질이동(protein localization to endoplasmic reticulum)과 관련된 유전자 온톨로지가 high-speed centrifuge법에 비해 reagent법에서 통계적 유의성이 높은 것을 확인하였다(Figure 4). 이는 앞선 결과에서, high-speed centrifuge법에서 소포체 막단백질이 reagent법에 비해 분석 가능한 막단백질을 더 많이 추출한 것과 연관되어 이들의 GO를 나타내는 것으로 해석된다. 또한, 단백질 기능 분석은 전반적인 네트워크의 차이점 분석을 위해 프로세스 네트워크분석을 진행하였다. high-speed Centrifuge법에서는 하나의 클러스터(cluster)가 전반적으로 모여 있는 것을 확인 할 수 있었던 반면에 reagent법에서는 네 가지 클러스터가 하나로 네트워크 하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 5). 이는 두 가지 추출법에 의해서, 추출된 막 단백질에 의해서 서로 다른 프로세스 네트워크를 그리는 것을 보여주는 결과이다.

고 찰

고해상 질량분석기는 세포 내 존재하는 전체적인 막 단백질을 동정하여 분석하는데 매우 유용한 정보를 제공한다[18]. 본 연구에서는 고해상 질량분석기로 Nano-Chip-LC/QTOF-MS를 사용하였으며 막 단백질의 추출 단계의 중요성을 근거로 가장 일반적으로 사용되는 막 단백질 추출 방법인 high-speed centrifuge법과 reagent법의 추출 효율을 비교 분석하였다. 결과적으로, 두 가지 방법에서 전체적으로 high-speed centrifuge법에서 막 단백질 추출 효율이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 하위 막 단백질 구성성분 분석에서, 미토콘드리아 내막 단백질 분석에는 high-speed centrifuge법이 유용한 반면 소포체막 단

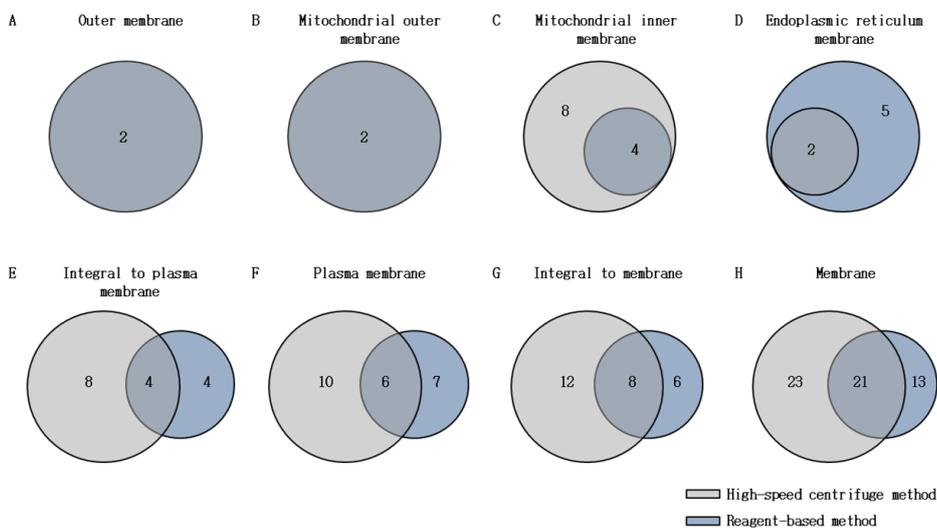


Figure 3. Venn diagram of identified membrane proteins that were classified as subcellular localization through Pandora server. Membrane proteins were classified into outer membrane, mitochondrial outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, integral to plasma membrane, plasma membrane, integral to membrane and membrane (A~H). Gray circle represents the membrane proteins that were extracted using high-speed centrifuge method and blue circle represents the membrane proteins that were extracted using reagent-based method.

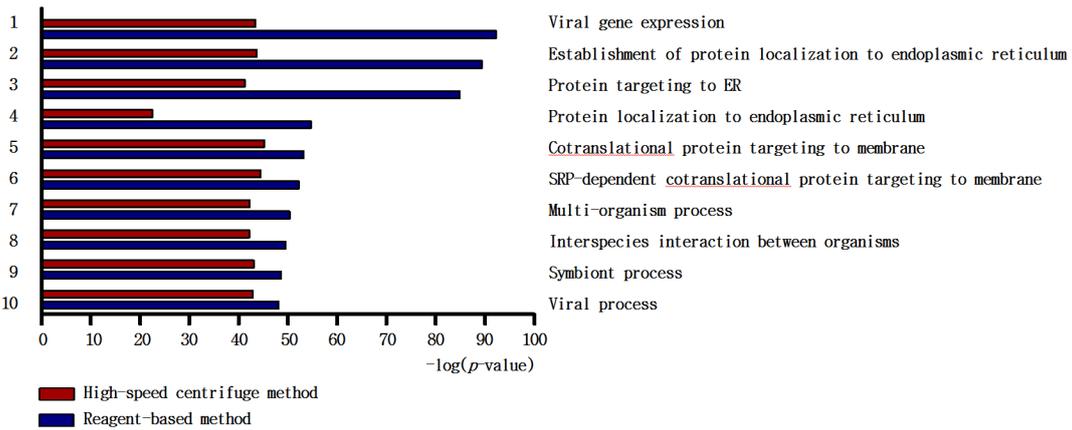


Figure 4. Functional analysis for total extracted membrane proteins using GeneGo. GO processes were analyzed using GeneGo. Red bar represents the GO processes that are associated with membrane proteins extracted using high-speed centrifuge method and blue bar represents the GO processes that are associated with membrane proteins extracted reagent-based method. The most associated GO processes was viral process in both high-speed centrifuge and reagent-based methods.

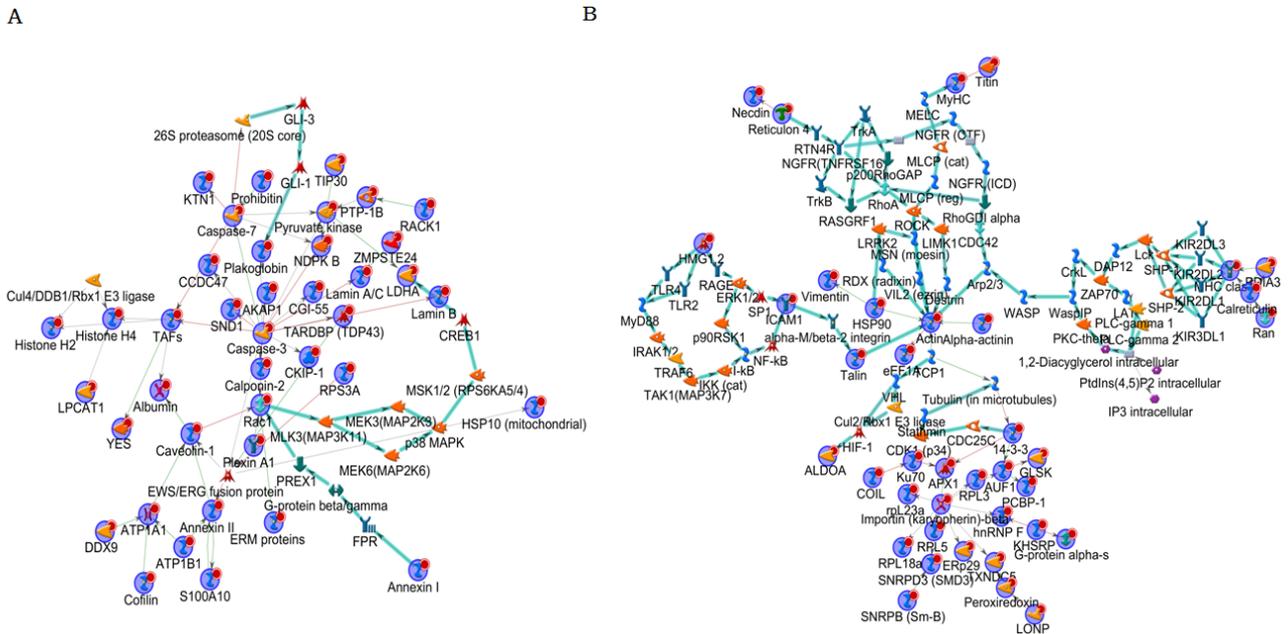


Figure 5. Process networks of total extracted membrane proteins in high-speed centrifuge and reagent-based method. The network was generated by a shortest paths algorithm of GeneGo software using the total extracted membrane proteins. (A) GeneGo process networks of total extracted membrane proteins using high-speed centrifuge method. (B) GeneGo process networks of total extracted membrane proteins using reagent-based method.

백질에서는 reagent법이 유용한 것을 확인할 수 있었다. 기능분석 결과에서는 전반적인 프로세스 네트워크를 비교했을 때, 두 가지의 추출법에서 서로 다르다는 것을 확인할 수 있었다. Reagent법에서 high-speed centrifuge법에 비해서 세포막의 signal recognition particle (SRP) 의존 공번역 단백질(SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane)에 관여하는 유전자 온톨로지가 통계적으로 유의하게 나왔다. 이는 막 단백질의 소수성 단백질이 SRP를 매개로 소포체 내에

저장되는 친수성 단백질이 되거나 소포체 막 단백질로 되는 과정이라 사료된다[19].

본 연구에서는 몇가지 한계점이 있다. 첫째, DU145 전립선암 세포 주를 사용하여, 막 단백질 분석을 진행하였다. 하지만 세포 주마다 하위 단백질의 비율 등이 다르기 때문에, DU145 전립선암 세포 주 이외의 다른 암 세포 주와 정상 세포 주에서도 동일하게 실험을 진행하여, 같은 결과를 얻을 수 있는지 검증하는 실험을 후속 연구로 진행할 필요가 있다고 생각한다. 둘째,

본 연구의 경우의 경우 막단백질을 추출하는 두가지 방법을 비교하기 위해서, 질량분석기를 통한 순수 막 단백질의 동정 효율성 및 각 분석법에서 효율적인 하위 막단백질을 확인하는 것에 초점에 두고 진행하였다. 이 과정에서, 단백질 변성 및 안정상태를 최적화하기 위해서, 막 단백질 추출과정에서 -4°C 를 유지하여 진행하였으며, 분석전까지 추출된 막 단백질은 -70°C 의 초저온냉장고에서 보관하거나 막단백질 추출 직후 분석을 진행하였다. 이번 연구에서는 질량분석기를 통해서 막단백질을 분석하는 방법론을 비교하는 것이지만, 추후 연구를 통해서, 막 단백질의 구조 연구가 필요한 경우에는 변성 및 응집에 의한 구조변화를 확인하는 방법론이 추가되어야 할 것이다. 마지막으로, 이번 연구에서는 Nano-Chip-LC/QTOF-MS 기기를 사용하여 분석을 진행하였다. 하지만, Nano-Chip-LC/QTOF-MS 이외에도 다양한 질량분석기기로 막 단백질 분석 연구가 진행 중이다. 예를 들면, Multiple reaction monitoring (MRM)과 같은 질량분석 장비를 사용하여 정성 분석, 뿐만 아니라 절대적 정량값 분석을 통한 발현 패턴의 분석도 진행되고 있다[18, 20]. MRM을 이용한 연구는 막단백질들에 대한 좀 더 구체적인 연구를 진행할 수 있다. 예를 들면, 이전 논문 결과에서는, 막단백질들 중에서 약물 전달자의 역할을 하는 막 단백질을 선정하여, 특정 세포주에서 정량분석을 진행한 연구 결과가 있다[21, 22]. 이러한 결과는 본 연구 논문과 같이 세포 주나 조직에서 막 단백질을 추출하여 막단백질을 분석하는 것은 동일하나, 다른 점은 추출된 막 단백질을 분석하는 이유와 같이, 약물반응 및 약물의 표적으로서의 연구를 좀 더 구체적으로 진행하기 위해서, 약물반응과 관련된 약물 전달자의 역할을 하는 단백질들만 선정하여, 표적물질의 정량분석 연구를 진행한 것이다. 후속 연구에서는 Nano-Chip-LC/QTOF-MS를 사용하여, 정성분석을 진행한 연구 결과를 바탕으로, MRM분석을 통해서 실제 활용과 연결될 수 단백체를 선정하여 검증하는 연구를 진행해야 할 것이다.

본 연구에서는 질량분석기를 이용한 단백질 동정은 매우 안정적인 것에 비해서, 두가지 추출법이 서로 다른 종류의 막 단백질에 대해서 좀 더 나은 추출 효율을 보이는 것과 서로 다른 프로세스 네트워크를 보여주는 것을 확인하였다. 이러한 결과는, 막 단백질 분석은 추출법에 따라서 결과 해석이 달라 질 수 있는 것을 보여주었으며, 막 단백질 추출에 있어서 소수성 단백질에 대한 이해와 이를 극복할 수 있는 효율적 방법론 구축 및 연구에 많은 노력이 필요하다는 것을 시사하고, 연구에 목적에 따른 막 단백질 추출 방법을 선택하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

요약

막 단백질은 심장질환, 암과 같은 우리 주변에서 흔히 발생하는 질병에 관련되어 있다. 이러한 암과 같은 특정한 질환 상태에서, 막 단백질과 관련된 신호 전달의 비정상성은 세포분열을 통제하지 못하고 증가시킬 수 있으며 막 단백질의 발현에 변화가 생긴다. 막 단백질은 지질 이중층으로 이루어진 소수성 환경을 가지고 있어 불안정하기 때문에 막 단백질을 추출해서 연구를 수행하는데 어려움이 있다. 이번 연구에서는 최적화된 막 단백질 추출법을 확인하고자 서로 다른 두 가지 추출법의 효율성을 평가하였다. 두 가지 방법으로, high-speed centrifuge법과 reagent법이 비교되었다. 비교 분석결과, 미토콘드리아 내막 단백질 분석에는 high-speed centrifuge법이 효율적이고, 소포체 막 단백질 분석에는 reagent법이 유용함을 확인하였다. 게다가 유전자 온톨로지 소프트웨어를 이용해서 추출된 막 단백질의 기능분석을 진행하였을 때, 유전자 온톨로지는 reagent법에서 소포체 막 단백질에 연관된 반응이 활성화 되는 것을 확인할 수 있었다. 프로세스 네트워크 분석에서, high-speed centrifuge법에서는 하나의 클러스터를 형성하는 반면, reagent법에서는 네 개의 클러스터를 형성하는 것을 시각화하여 확인하였다. 결론적으로, 두 가지 분석법은 서로 다른 하위 막 단백질의 분석에 유용함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로, 막 단백질을 분석할 때, 표적의 세부 막 단백질을 고려하여 방법론을 선택하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

Acknowledgements: This research was supported by the bio & Medical Technology Development Program of the NRF funded by the Korean government, MSIP (Grant No. 2016M3A9B694241).

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Lee J¹, Adjunct professor; Seok AE¹, Graduate student; Park A¹, Graduate student; Mun S², Graduate student; Kang HG^{1,2}, Professor.

REFERENCES

1. Wu CC, Yates III JR. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol.* 2003;21:262. <http://doi.org/10.1038/nbt0303-262>.
2. Tan S, Tan HT, Chung MC. Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics.* 2008;8:3924-3932. <http://doi.org/10.1002/pmic.200800597>.
3. Liu X, Zhang M, Go VL, Hu S. Membrane proteomic analysis of

- pancreatic cancer cells. *J Biomed Sci.* 2010;17:74. <http://doi.org/10.1186/1423-0127-17-74>.
4. Adam PJ, Boyd R, Tyson KL, Fletcher GC, Stamps A, Hudson L, et al. Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. *J Biol Chem.* 2003;278:6482-6489. <http://doi.org/10.1074/jbc.M210184200>.
 5. Zhang W, Zhou G, Zhao Y, White MA, Zhao Y. Affinity enrichment of plasma membrane for proteomics analysis. *Electrophoresis.* 2003;24:2855-2863. <http://doi.org/10.1002/elps.200305569>.
 6. Rucevic M, Hixson D, Josic D. Mammalian plasma membrane proteins as potential biomarkers and drug targets. *Electrophoresis.* 2011;32:1549-1564. <http://doi.org/10.1002/elps.2011-00212>.
 7. Simpson RJ, Connolly LM, Eddes JS, Pereira JJ, Moritz RL, Reid GE. Proteomic analysis of the human colon carcinoma cell line (LIM 1215): development of a membrane protein database. *Electrophoresis.* 2000;21:1707-1732. [http://doi.org/10.1002/\(sici\)1522-2683\(20000501\)21:9<1707::aid-elps1707>3.0.co;2-q](http://doi.org/10.1002/(sici)1522-2683(20000501)21:9<1707::aid-elps1707>3.0.co;2-q).
 8. Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Kassel M. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells.* 2005;23:1367-1377. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0372>.
 9. Rikke Leth-Larsen, Rikke R. Lund, Ditzel HJ. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9:1369-1382. <http://doi.org/10.1074/mcp.R900006-MCP200>.
 10. Leth-Larsen R, Lund R, Hansen HV, Laenkholm AV, Tarin D, Jensen ON, et al. Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8:1436-1449. <http://doi.org/10.1074/mcp.M800061-MCP200>.
 11. Vuckovic D, Dagley LF, Purcell AW, Emili A. Membrane proteomics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Analytical approaches and challenges. *Proteomics.* 2013;13:404-423. <http://doi.org/10.1002/pmic.201200340>.
 12. Savas JN, Stein BD, Wu CC, Yates III JR. Mass spectrometry accelerates membrane protein analysis. *Trends Biochem Sci.* 2011;36:388-396. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.04.005>.
 13. Lindemann C, Thomanek N, Hundt F, Lerari T, Meyer HE, Wolters D, et al. Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. *Biol Chem.* 2017;398:687-699. <http://doi.org/10.1515/hsz-2017-0104>.
 14. Laganowsky A, Reading E, Hopper JT, Robinson CV. Mass spectrometry of intact membrane protein complexes. *Nat Protoc.* 2013;8:639-651. <http://doi.org/10.1038/nprot.2013.024>.
 15. Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis.* 2009;30(Suppl 1):174-180. <http://doi.org/10.1002/elps.200900050>.
 16. Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Yates Iii JR. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol.* 2003;21:532. <http://doi.org/10.1038/nbt819>.
 17. Lai X. Reproducible method to enrich membrane proteins with high purity and high yield for an LC-MS/MS approach in quantitative membrane proteomics. *Electrophoresis.* 2013;34:809-817. <http://doi.org/10.1002/elps.201200503>.
 18. Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai k, et al. Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res.* 2008;25:1469-1483. <http://doi.org/10.1007/s11095-008-9532-4>.
 19. Guerriero CJ, Brodsky JL. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol Rev.* 2012;92:537-576. <http://doi.org/10.1152/physrev.00027.2011>.
 20. Nouri MZ, Komatsu S. Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Proteomics.* 2010;10:1930-1945. <http://doi.org/10.1002/pmic.200900632>.
 21. Prasad B, Unadkat JD. Optimized approaches for quantification of drug transporters in tissues and cells by MRM proteomics. *Aaps J.* 2014;16:634-648. <http://doi.org/10.1208/s12248-014-9602-y>.
 22. Uchida Y, Ohtsuki S, Kamiie J, Ohmine K, Iwase R, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics for 28 human transporters in plasma membrane of Caco-2 cell monolayer cultured for 2, 3, and 4 weeks. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2015;30:205-208 <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2014.11.002>.