

대두 Bowman-Birk형 proteinase inhibitor들의 분리 및 성질

최기봉 · 김수일

서울대학교 농화학과

초록 : 황금종 대두로부터 8종의 Bowman-Birk형 proteinase inhibitor들을 DEAE-Sephadex A-50으로 전기영동상 단일 band로 순수하게 분리하였다. 이 중 inhibitor VII은 cysteine함량이 17%로 높고 trypsin 및 chymotrypsin에 대해 각각 독립적인 결합부위를 가지고 있으며 상기 두 효소에 대한 저해활성도의 비(TIA/CIA)가 1.0으로 전형적인 Bowman-Birk trypsin inhibitor(BBTI)로 확인되었다. 본 inhibitor와 trypsin 및 chymotrypsin complex의 dissociation constant는 각각 $9.17 \times 10^{-9}M$ 과 $5.14 \times 10^{-9}M$ 로 매우 안정하였다. 또한 inhibitor VII은 열에 매우 안정한 단백질로 100°C, 6시간 처리에도 저해활성도 감소가 50%밖에 안되었다. 순수분리된 7종의 다른 isoinhibitor 중 inhibitor III만이 TIA/CIA 값이 1.2로 BBTI와 비슷하였으나 그외 inhibitor I, II, IV, V, 및 VIII은 그 값이 3~29로 BBTI와는 성질이 다른 isoinhibitor로 추정되었다(1990년 10월 16일 접수, 1990년 12월 22일 수리).

대두의 Bowman-Birk trypsin inhibitor(BBTI)는 황 함유 아미노산 함량이 부족한 대두에서 cysteine함량이 가장 높은 단백질로서¹⁾ Bowman²⁾에 의하여 최초로 보고된 이래 아미노산 조성과 배열순서, trypsin 및 chymotrypsin의 결합부위^{3, 4)}, 발아 도중의 변화^{5, 6)}, 유전자 cloning^{7, 8)} 등에 대한 연구가 행하여졌다. 분자량이 8,000정도인 이 단백질분해효소 저해제는 14개의 cysteine을 포함한 71개의 아미노산으로 구성되어 있으며⁹⁾ 각각 trypsin 및 chymotrypsin과 결합하는 2개의 active site를 갖고 있는 double headed structure를 가지고 있다⁴⁾. 대두에는 이러한 전형적인 BBTI 이외에 BBTI와 함께 추출되는 isoinhibitor가 존재함이 보고되고 있다^{9~11)}. 이들은 분자량 및 cysteine 함량이 각각 7,000~8,000, 10~14 residue/mole로 BBTI와 유사하나 proteinase의 저해양상이 상이하고¹²⁾ 품종에 따라 존재하는 isoinhibitor 종류가 다른 것으로 나타나고 있다^{12, 14, 19)}. 본 실험에서는 한가지 대두품종으로부터 BBTI와 7종류의 그 isoinhibitor를 전기영동상 단일 band로 분리하였고 이들의 proteinase 저해양상 및 BBTI의 물리화학적 성질을 검토하여 보았다.

재료 및 방법

재 료

서울대학교 농화학에서 1986년 수확, 보관중인 황금종 대두를 분쇄후 시료로 사용하였다.

추출 및 정제

이등¹⁵⁾의 방법에 따라 시료로부터 0.25% H₂SO₄ 용액으로 inhibitor를 추출하고 acetone으로 침전시켜 crude proteinase inhibitor를 조제하였다. Crude proteinase inhibitor는 0.076M Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 용해시킨후 노등¹⁴⁾의 방법에 따라 Sephadex G-75를 사용, gel filtration으로 정제하였다.

Ion exchange chromatography

DEAE-Sephadex A-50을 상기 Tris-HCl buffer에 팽윤시키고 column(2×60cm)에 충전한 후 gel filtration으로 정제한 inhibitor 200mg을 buffer에 녹여 column에 주입하였다. 300ml까지 동일 buffer로 용출 후 0~0.2M NaCl linear gradient 용출을 하였으며 용출 속도는 18ml/hr, 분획은 6ml로 하였다. 각 분획은 280nm에서의 흡광도와 trypsin 저해 활성도를 측정 후 저해활성도 보유 분획을 모아 증류수에 투석, 냉동 건조하였다.

Proteinase 저해활성도 측정

Trypsin 및 chymotrypsin 저해활성도는 노등¹⁴⁾의 방법에 따라 N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide 및 casein을 기질로 사용하여 측정하였으며 저해 활성도는 %단위로 환산하여¹⁴⁾ 나타내었다. BBTI 첨가량에 따른 proteinase 저해정도 실험에서는 trypsin 및 chymotrypsin의 농도를 각각 55µg/ml와 50µg/ml로 고정하고 5µg~100µg/ml의 BBTI 농도에서 각 proteinase활성도를 측정하여 proteinase 저해곡선을 작성하였다¹⁶⁾.

Proteinase 결합 부위 검정

Chymotrypsin과 BBTI를 반응시켜 complex를 형성시킨 다음 trypsin을 농도별로 첨가하고 trypsin 저해 활성도를 측정하였다. 이때 chymotrypsin 농도는 69µg/ml, 138µg/ml, 275µg/ml의 3수준으로 하였으며 BBTI는 25µg/ml로, trypsin은 50~300µg/ml로 하였다.

열안정성 측정

100°C 항온수조에서 25µg/ml BBTI 용액을 6시간 까지 시간별로 가열한 후 0°C로 급냉하고 이들의 trypsin 저해활성도를 측정하였다.

PAGE

10% acrylamide gel을 사용하여 노등¹⁴⁾의 방법에 따라 행하였으며 탈색한 전기영동 gel의 protein band는 Densitometer(Densitrol DMU-33C Toyo Inc.)로 620nm에서 scanning하였다. 각 전기영동 band의 proteinase 저해활성도는 전기영동 후 gel을 2mm씩 자른 후 Tris-HCl buffer(pH 8.1)로 단백질을 추출하고 추출액의 저해활성도를 측정하여 검정하였다.

아미노산 조성 분석

BBTI 5mg에 6N-HCl 6ml를 첨가, 110°C에서 24시간 가수분해후 증발건조하고 0.2N sodium citrate buffer(pH 2.2) 5ml에 용해시켜 아미노산 분석에 사용하였으며 cysteine함량은 performic acid로 산화시킨 후 가수분해하였다¹⁷⁾. 아미노산 분석기는 Hitachi KLA5 model을 사용하였다.

결과 및 고찰

Crude proteinase inhibitor의 추출 정제

황금종 대두 전단백질의 22.9%가 inhibitor로 추출되었고 시료의 총 proteinase 저해 활성도를 기준으로 하면 trypsin 저해 활성도(TIA)는 49.2%, chymotrypsin 저해 활성도(CIA)는 39.8%가 시료로부터 추출되었다. Gel filtration에 의해 정제된 inhibitor¹⁴⁾는 PAGE에 의해 8개 band(band I~VIII)로 분리되었으며(Fig. 1) 모두 TIA 및 CIA를 보유하고 있었으나 이중 CIA는 band VII에서 특히 높게 나타났다(Fig. 2).

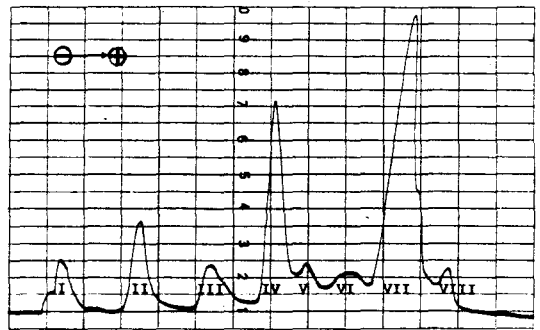


Fig. 1. Polyacrylamide gel densitogram of the purified proteinase inhibitors on Sephadex G-75

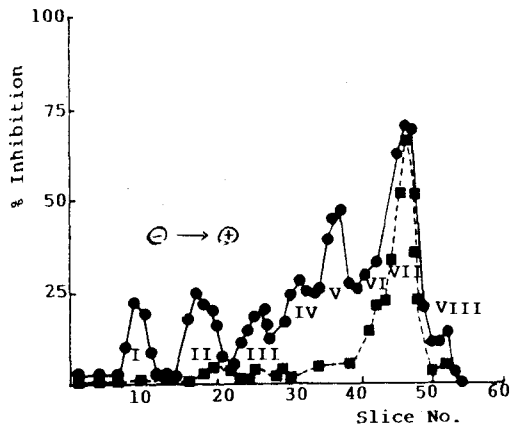


Fig. 2. Trypsin and chymotrypsin inhibiting activities in polyacrylamide gel slices of purified proteinase inhibitor on Sephadex G-75.

●-● : TIA and ■-■ : CIA.

Proteinase inhibitor들의 순수분리

Gel filtration에 의해 정제된 inhibitor를 DEAE-

Sephadex A-50 column chromatography한 결과 280nm에서의 흡광도를 기준으로 10개의 peak가 나타났으며 이중 7개의 peak(1~7)가 TIA를 보유하고 있었다(Fig. 3). 이들 7개의 peak의 단백질을 냉동건조하고 PAGE를 행한 결과 band V와 VI을 제외하고는 모두 단일 band를 나타내어 이들을 iso inhibitor I, II, III, IV, VII, VIII로 명명하였으며 따라서 본 DEAE-Sephadex A-50으로 8개의 iso inhibitor중 6개를 전기영동상 순수하게 분리할 수 있었다(Fig. 4). Inhibitor V와 VI은 전기영동 gel의 해당하는 위치를 자른 후 Tris-HCl buffer(pH 8.1)로 단백질을 추출하여 분리하였다. 시료 100g을 기준으로 할 때 Sephadex G-75에 의해 정

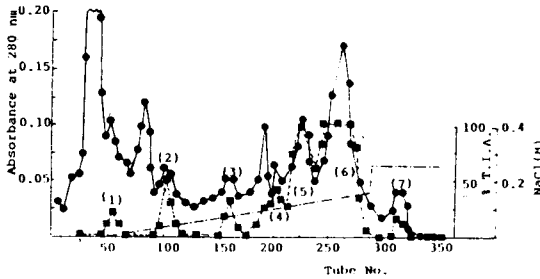


Fig. 3. Ion exchange chromatography of the purified proteinase inhibitors on DEAE-Sephadex A-50.

●—● : Absorbance at 280nm, ■—■ : TIA and - - - : NaCl (M).

Table 1. Amounts and proteinase inhibiting activities of Bowman-Birk type inhibitors from 100g soybean meal

		TIA/mg CIA/mg TIA/CIA			
Crude extract		7.04g	496	167	3.0
Sephadex G-75		254mg	1,393	1,100	1.3
DEAE-Sephadex A-50					
Peak	Isoinhibitor				
1	I	4.7mg	231	78	3.0
2	II	5.7 "	435	15	29.0
3	III	5.4 "	310	251	1.2
4	IV	3.6 "	339	88	3.9
5	V, VI	15.3 "	1,008	338	3.0
	V		528	90	5.9
	VI		818	48	17.0
6	VII	43.9 "	1,799	1,765	1.0
7	VIII	3.7 "	128	58	4.0

TIA : Trypsin inhibiting activity, CIA : Chymotrypsin inhibiting activity.

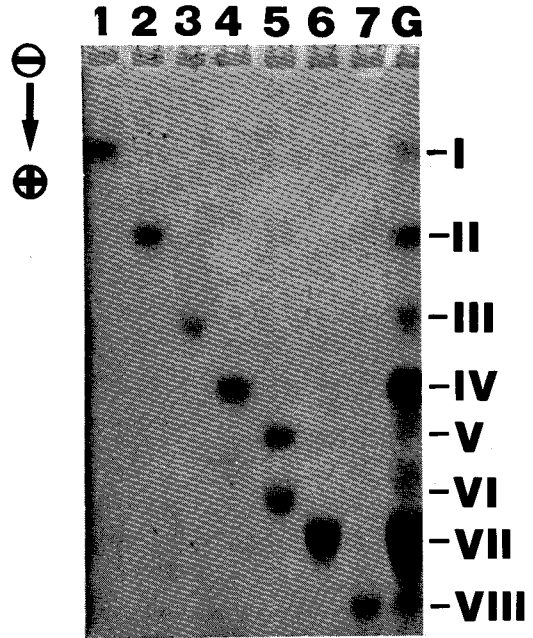


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of fractions separated by DEAE-Sephadex A-50.

G : The purified proteinase inhibitors on Sephadex G-75.

I~VIII : Band number.

1~7 : Fractions on DEAE-Sephadex A-50.

제된 inhibitor의 수량은 254mg이었으며 DEAE-Sephadex A-50에 의해 순수분리된 iso inhibitor의 양은 3.7~43.9mg으로서 이 중 inhibitor VII이 43.9mg으로 제일 수량이 높았다(Table 1).

iso inhibitor들의 proteinase 저해 활성도 비교

분리된 각 inhibitor의 mg당 proteinase 저해 활성도를 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. Inhibitor VII이 저해 활성도가 가장 높아 TIA가 1,799, CIA가 1,765이었으며 TIA/CIA도 약 1.0으로 나타났다. 따라서 이 inhibitor는 전형적인 Bowman-Birk trypsin inhibitor(BBTI)로 추정되었으며 이는 아미노산 분석, proteinase 결합부위 등 다음의 결과로 확인하였다. 분리된 8종의 inhibitor 중 V와 VI은 BBTI인 inhibitor VII에 이어 TIA가 각각 518, 878로 가장 높았으나 CIA가 90과 48로 trypsin과 chymotrypsin을 같은 비율로 저해하는 BBTI¹⁰⁾와는 다른 형의 inhibitor로 추정된다. Inhibitor III은 저해 활성도는 낮으나 TIA/CIA가 1.2로서 BBTI와 유사한 것으로 보이며 그의 inhibitor I, II, VI, VIII은 TIA/CIA가 3이상으로 inhibitor

V, VI 과 같이 trypsin과 chymotrypsin을 동시에 저해하는 double headed structure를 가지고 있지는 않는 것으로 추정되었다¹⁰⁾. 그러나 이들 isoINHIBITOR의 상관관계는 아미노산 배열순서, 저해작용 기작, 면역학적 분석비교, 관련 유전자의 cloning 및 분석 등에 대한 연구가 진행되어야 정확히 알 수 있을 것이다.

Inhibitor VII(BBTI)의 성질

1) 아미노산 조성

Inhibitor VII의 아미노산 조성은 mole당 아미노산 residue로 표시하여 Table 2에 나타내었다.

Asx와 cysteine은 각각 12 residue로서 제일 많이 포함되어 있으며 His, Gly, Val, Met, Ile이 각각 1 residue로 최소 아미노산이었다. Inhibitor VII의 아미노산 조성은 총 아미노산 residue 수에서 Odani등³⁾과 Hwang등⁹⁾의 BBTI에 대한 실험 보고에 비하여 2~4개의 차이가 있고 cysteine, glycine, proline, Glx에서 1~2개의 차이가 있으나 다른 아미노산 residue 수는 동일하였다.

Table 2. Amino acid composition of inhibitor

Amino acid	(residue/mole)*		
	Inhibitor VII	BBTI-1	BBTI-2
Lys	5	5	5
His	1	1	1
Arg	2	2	2
Asx	12	11	12
Thr	2	2	2
Ser	9	9	9
Glx	6	8	7
Pro	5	6	6
Gly	1	0	1
Ala	4	3	4
Cys 1/2	12	14	14
Val	1	1	1
Met	1	1	1
Ile	1	1	1
Leu	2	2	2
Tyr	2	2	2
Phe	2	2	2
Total	69	71	73

* : Calculated for a molecular weight of 8,000^{3, 12)}.

BBTI-1 : Odani et al.(1973).

BBTI-2 : Hwang et al.(1977).

2) Proteinase 결합부위

Chymotrypsin과 inhibitor VII이 complex를 이룬 상태에서 trypsin 농도를 달리하여 잔류 TIA를 측정 한 결과 chymotrypsin의 첨가 여부나 첨가량에 상관없이 TIA는 trypsin 첨가량에 비례하는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 따라서 inhibitor VII은 BBTI와 동일하게 chymotrypsin, trypsin에 대하여 독립적으로 결합하는 두개의 각각 다른 결합부위(active site)를 가지고 있는 것이 확인되었다.

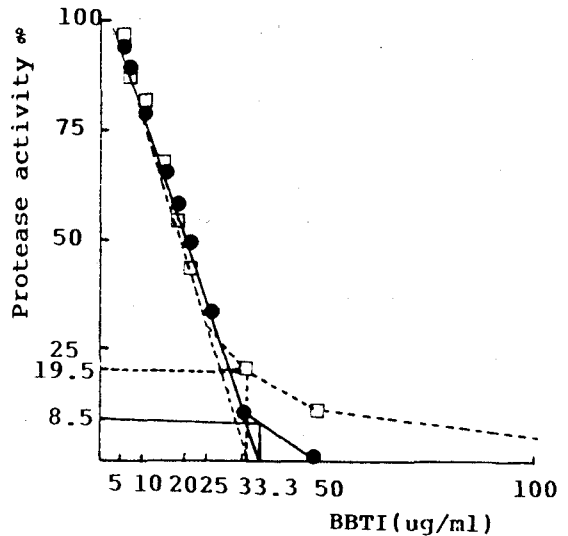


Fig. 5. Trypsin and chymotrypsin activities remained in inhibitor VII solutions of different concentration.

●—● : Trypsin activity and □—□ : Chymotrypsin activity.

3) Dissociation constant

Trypsin 및 chymotrypsin의 농도를 고정하고 inhibitor VII을 증가시키면서 잔존하는 각 proteinase의 활성도를 측정 한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. BBTI는 두개의 proteinase와 각각 1:1의 mole 비로 complex를 형성한다⁷⁾. 본 inhibitor VII이 전형적인 BBTI임이 확인 되었으므로 이들의 1:1 complex 형성농도를 저해곡선의 직선부분 연장으로 구하였으며 그 농도는 trypsin은 37.5 μ g/ml, chymotrypsin은 35 μ g/ml이었다. 각 농도에서 잔존 저해활성도는 trypsin은 8.5, chymotrypsin은 19.5%로 나타났다. $IP \rightleftharpoons I+P$ (I : inhibitor, P : proteinase)이라 할 때 dissociation constant K_d 는 각각 $9.17 \times 10^{-9}M$, $5.14 \times 10^{-9}M$ 로 계산되었다. 이는 Kunitz형 trypsin inhibitor의 K_d 값 $2.6 \times 10^{-10}M$ ¹⁶⁾

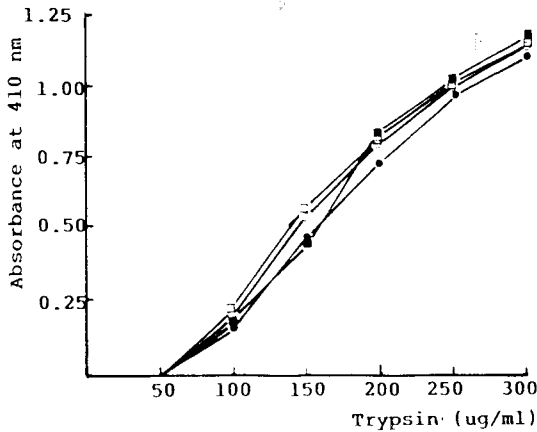


Fig. 6. Changes in trypsin activities due to the amount of trypsin added in solutions containing inhibitor VII and chymotrypsin.

Chymotrypsin concentration : 0 ug/ml, 69 ug/ml, 138 ug/ml and 275 ug/ml.

보다는 높은 값으로 Bowman-Birk형 trypsin inhibitor가 비교적 더 잘 해리됨을 나타내었다.

4) 열안정성

Inhibitor VII을 100°C에서 시간별로 가열처리 후

TIA를 측정된 결과 TIA는 가열 시간에 비례하여 감소함을 나타내었고 6시간에 이르러서야 50%의 TIA 감소가 나타났다(Fig. 7). 이는 Kunitz형 inhibitor가 67°C, 2~4분 가열로 50%의 TIA 감소가 일어남¹⁸⁾과 비교하여 볼 때 본 inhibitor는 열에 매우 안정한 것으로 나타났다.

본 inhibitor의 cysteine 함량이 17% 이상임을 고려할 때 이러한 열안정성은 분자내의 disulfide bond 형성에 기인한다고 할 수 있겠다.

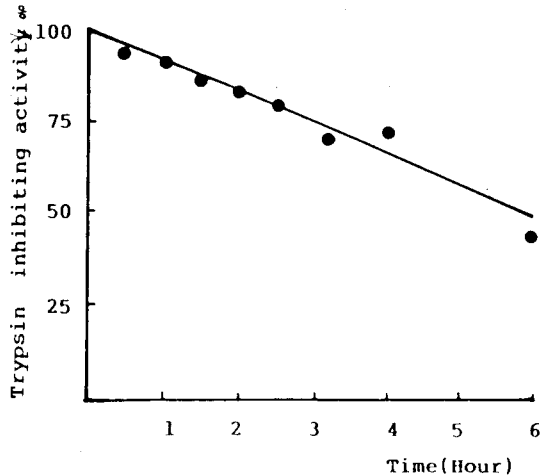


Fig. 7. Heat stability of inhibitor VII at 100°C

참 고 문 헌

- Kosuge, M., Meredith, C. P. and Hollaender, A. : In 'Basic life science, Vol. 26, Genetic engineering of plants', An Agricultural Perspective(1983)
- Bowman, D. E. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57 : 139(1944)
- Odani, S. and Ikenaka, T. : J. Biochem., 71 : 839 (1972)
- Odani, S. and Ikenaka, T. : J. Biochem., 74 : 697 (1973)
- Madden, M. A., Tan-Wilson, A. L. and Wilson, K. A. : Phytochem., 24 : 2811(1985)
- Tan-Wilson, A. L., Rightmire, B. R. and Wilson, K. A. : Plant Physiol., 70 : 439(1982)
- Flecker, P. : Eur. J. Biochem., 166 : 151(1987)
- Hammond, R. W., Foard, D. E. and Larkins B. A. : J. Biol. Chem., 259 : 9883(1984)
- Hwang, D. L. R., Lin, K. T. D., Yang, W. K. and Foard, D. E. : Biochem. Biophys. Acta, 495 : 369 (1977)
- Odani, S. and Ikenaka, T. : J. Biochem., 82 : 1523 (1977)
- Odani, S. and Ikenaka, T. : J. Biochem., 83 : 737 (1978)
- Ikenaka, T. and Norioka, S. : In 'Proteinase inhibitors', Dingle J. T. and Gordon J. L. (ed), Chap. 9, Elsevier(1986)
- Stahlhut, R. W. and Hymowitz, T. : Crop Sci., 23 : 766(1983)
- 노범섭, 이홍석, 김수일 : 한국농화학회지, 32 : 166(1989)
- 이홍석, 이석하, 문항식, 나지영, 김수일 : 서울대 농학연구, 10 : 108(1985)
- Green, N. M. and Work, E. : Biochem., 54 : 347 (1953)
- Moore, S. : J. B. Chem., 238 : 235(1963)
- Sanderson, J. E., Freed, R. C. and Ryan, D. S. : Biochim. Biophys. Acta, 701 : 237(1982)
- Tan-Wilson, A. L., Chen, T. C., Dugan, M. C., Chapman, C., Obach, R. S. and Wilson, K. A. : J. Agric. Food Chem., 35 : 974(1987)

Bowman-Birk type proteinase inhibitors from soybean : Isolation and partial characterization
Ki-Bong Choi and Su-Il Kim(Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University,
Suwon 440-744, Korea)

Abstract : Eight(I through VIII) of Bowman-Birk proteinase inhibitors have been isolated from soybean with DEAE-Sephadex A-50. Inhibitor VII was a typical BBTI, showing high cysteine content(17%/mole) and low trypsin to chymotrypsin inhibiting activity(TIA/CIA=1.0) with the independent reactive site to each enzyme. Dissociation constant of trypsin-BBTI and chymotrypsin-BBTI complexes were 9.17×10^{-9} M and 5.14×10^{-9} M, respectively. Inhibitor VII was extremely heat stable. Six hours heat treatment at 100°C caused only 50% decrease in its original inhibiting activity. Except inhibitor III, 6 other isoinhibitors differed from a typical BBTI in TIA/CIA values, ranging from 3 to 29.