

콩단백질의 대장균 발현과 정제

오문헌 · 정재홍 · 노영희* · 이희봉*

충청전문대학 식품공업과, 충북대학교 식품공학과*

Expression and Purification of Soybean Protein from *Escherichia coli*

Moon-Hun Oh, Jae-Hong Chung, Young-Hee Noh* and Hee-Bong Lee*

Dept. of Food Science and Technology, Chung-Cheong Junior College Kongnae, Chungwon, Chungbuk, 363-890 Korea

Dept. of Food Engineering, Chung-Buk National University.* Cheongju, Chungbuk, Korea

Abstract

One of the major objectives of the food industry is the enrichment of the functional properties and nutritional value of soybean protein. To attain this goal, an expression system of cDNA encoding native and protein-engineered soybean proteins in a microorganism must be developed and the function then ability of self-assembly and the functionalities of the expressed proteins should be evaluated before the modified genes are transferred to soybean plants. The pro- β -conglycinin synthesized in *E. coli* BL21(DE3) comprised approximately 20% of the total bacterial proteins and the expressed protein are formed soluble and trimer such as native protein in *E. coli* cells. The highly expressed protein was purified to homogeneity by salt precipitation with 20~40% Ammonium sulfate ion-exchange chromatography with Q-Sepharose and hydrophobic column chromatography with Butyltoypearl. Therefore, we concluded that the high-level expression system of β -conglycinin cDNA was established and a relatively simple and rapid method for purifying pro- β -conglycinin was also developed.

Key words : β -conglycinin, expression, purification, *Escherichia coli*

서 론

현재 세계에는 포식과 기아라고 하는 상반된 문제가 존재한다. 앞으로 30년 후에는 세계인구가 약 80억에 달하리라 예측 되기 때문에¹⁾ 식량문제는 중요한 문제이며 그중에서도 단백질 자원은 더욱 부족할 것으로 생각된다.

동물성 단백질 자원은 식물성 단백질 자원에 비하여 경제성, 공급 및 이용 효율이 뛰어나지 않지만 영양 및 기능 면에서는 우수하다²⁾. 한편 식물성 단백질은 성인병 유발의 걱정을 하지 않아도 된다. 동물성 단백질은 섭취하는 과정에서 과잉의 지방이 섭취되어 혈중 콜레스테롤의 농도가 높아질 수 있기 때문이다^{3,4,5)}.

따라서 식물성 식품 단백질의 영양 가치 및 기능을 향상시킬 수 있다면 단백질 섭취 및 성인병 유발을 막을 수 있고 식품산업의 소재로서 용도가 커질 수 있다.

이러한 바탕에서 최근 유전자공학을 단백질화학에 도입하여 유용한 식물성 식품단백질을 설계하려는 시도가

많다. 그 중 콩단백질은 연구의 주요 대상이 되고 있다⁶⁾.

콩단백질은 glycinin과 β -conglycinin을 주성분으로 한다. 글리시닌은 다른 단백질에 비하여 영양성 및 기능이 뛰어나 식품공업에 많이 이용되고 있다. 그러나 동물성 단백질보다 영양적으로 함황 아미노산이 적고 가공성이 뛰어나지 못하다⁷⁾. 따라서 이의 해결을 위한 노력으로 Utsumi 등^{8,9,10)}은 단백질공학으로 품질을 설계하여 좋은 성과를 거둔 바 있다. 그러나 β -콘글리시닌에 대한 연구는 많지 않다^{11,12)}. 또한 최근 Ogawa 등^{13,14)}은 콩단백질의 알레르기원이 β -콘글리시닌으로 밝혀지면서 β -콘글리시닌에 대한 연구 필요성은 더욱 요구되고 있다. 따라서 본 결과는 콩단백질의 영양성 및 가공 특성의 개선과 알레르기 원인을 규명하기 위해 β -콘글리시닌의 β -서브유닛을 대상으로 대장균 발현계를 확립하고 정제를 시도하여 얻은 결과이다.

재료 및 방법

1. 재 료

제한효소 *Nco* I, *Bam* HI 등은 Takara Shozu, 발현 Vector pET 21d 와 숙주균 *Escherichia Coli* BL21(DE3) (F^-ompT hsdSB ($r_B^- m_B^-$) gal dcm (DE3) genotype)은 Novagen, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)는 Nakarai Chemicals, phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF)는 Sigma, Bacto tryptone과 Bacto yeast extract는 Difco, Q-Sepharose는 Pharmacia, TSK gel Butyltoyopearl 650M은 Tosoh제품을 사용하였다. 기타 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 유전자 클로닝

등숙기 콩자엽으로부터 RNA를 추출하고 Okiyama-Berg법¹⁵⁾으로 cDNA library를 작성하였다. 다음 이미 보고^{16,17,18)}된 염기배열로부터 Oligonucleotide를 합성하고 그것을 probe로 하여 β -콘글리시닌 단백질의 β -서브유닛에 대한cDNA를 클로닝하였다. 얻어진 cDNA는 벡터의 *Nco* I 부위, *Bam* HI 부위에 삽입하기 쉽도록 polymerase chain 반응(PCR)을 하였다. 얻어진 산물은 *Bam* HI으로 처리하고 발현벡터 pET 21d에 ligation시켰다. 이 발현 Plasmid를 *E. Coli* BL21(DE3)에 형질전환시켰다.

3. 유전자 대량발현

2l용 삼각 플라스크에 LB 배지 (pH 7.5, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1%NaCl, Carbenicillin 25ug/ml) 600ml를 넣었다. 다음 동일 배지에서 하루밤 배양한 전배양액 6ml를 넣고 37℃에서 160 stoke/min 속도로 진탕배양하였다. 배양중 600nm의 흡광도가 0.6일 때 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)유도체를 최종농도 1 mM이 되도록 첨가하였다. 다음 20℃ 에서 20시간 진탕배양시켜 단백질을 발현시켰다.

4. 발현단백질의 분석

대장균 균체를 얻기 위하여 5000rpm, 4℃, 20min. 원심분리하였다. (원심분리기, MR15A, Tomy Seiko사) 침전물은 SDS-sample완충액 (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 0.2M 2-mercaptoethanol)으로 가열, 용해시키고 Laemmli의 방법¹⁹⁾에 따라 11% SDS polyacrylamide겔 전기영동하였다. 단백질은 Coomassie brilliant blue R-250

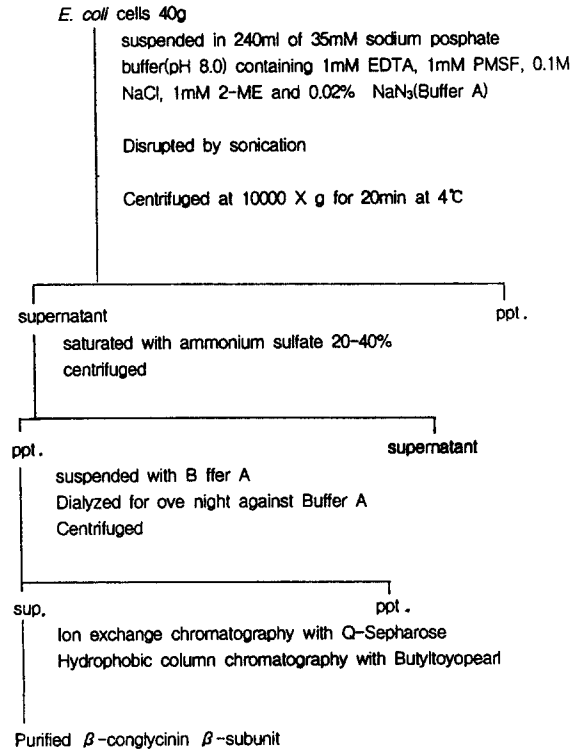


Fig. 1. Purification procedure of β -conglycinin β -subunit from *E. coli*.

으로 염색시켰다. Scanning은 Densitometer(Shimadzu Dualwavelenth TLC Scanner CS-910, Shimadzu Co. Ltd.)를 사용하였다.

5. 발현단백질의 정제

발현시킨 단백질의 β -콘글리시닌의 β -서브유닛은 Fig. 1과 같이 정제하였다. 즉 발현시킨 대장균(Wet weight) 40그램을 35mM sodium phosphate buffer(pH 8.0, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM 2-ME, 0.1M NaCl 함유) 240ml에 현탁시키고 4℃에서 200W로 초음파(Insonator 201M, Kubota Co. Ltd.)로 파괴시켰다. 다음 원심분리(Hitachi HIMAC centrifuge SCR 20B)하여 상정액을 얻었다. 상정액은 $(NH_4)_2SO_4$ 20~40%의 황산암모늄으로 분별침전하였다. 황산암모늄 침전물은 상기 완충액중에서 0.1M NaCl부터 0.4M의 NaCl농도로 Q-Sepharose 컬럼으로 HPLC(Shimadzu LC 10Ai)하였다. 다음 β -콘글리시닌의 β -서브유닛 주분획을 모아 상기 완충액 중

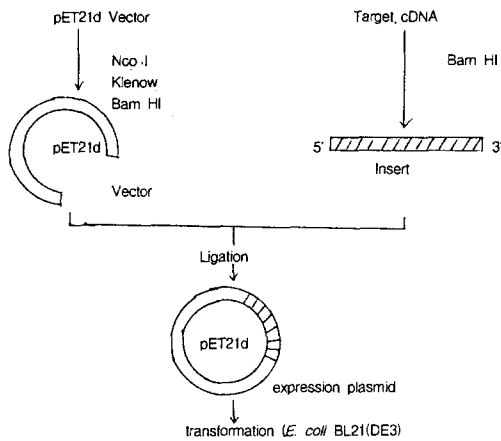


Fig. 2. Scheme for construction of expression plasmid for β -conglycinin β -subunit.

에서 Butyltoyopearl의 소수성 컬럼 크로마토그래피하여 25% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 로부터 0% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 까지 농도 기울기하였다.

6. 단백질 정량

단백질은 Bradford의 방법²⁰⁾으로 측정하였다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 유전자 클로닝

콩 자엽 cDNA library로부터 클로닝하였다. 사용한 프로브는 합성 올리고뉴클레오타이드를 r32pATP로 말단을 표지하였다. 1차 스크린시 8만개중 390개의 양성 클론을 얻고 다시 프로브를 제거하여 하이브리드화하였다. 그 후 2차 스크린하여 12개의 클론을 분리하고 pBluescript phagemid에 변환시켰다. 다음 제한효소로 분해시켜 vector 및 insert 단편을 확인하고 Sac I로 분해하여 선별하였다. 다음 5'측과 3'측으로부터 배열을 분석하여 이미 보고된 것과 같은 완전사슬을 분리하고 primer를 이용 β -콩글리시닌의 β -서브유닛 영역에 대응하는 유전자 단편을 조제하여 5'측은 N-말단, 3'측은 stop 코돈, 이하에 Bam HI 부위를 만들었다. 다음 insert 단편을 함유한 PCR 산물을 에탄올로 침전 Bam HI으로 분해하고 전기영동으로 회수하였다. 벡터는 pET 21d를 Nco I 분해 후 klenow처리, Bam HI으로 분해하여 전기영동으로 회수하였다. 양자를 ligation시키고 발현 플라스미드를 만들었다. 다음 Hind

III와 Nco I 분해로 pET 21d와 5'측의 junction을 확인한 후 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켰다.(Fig. 2)

2. 단백질의 발현 및 발현단백질의 특성

발현 플라스미드를 구축하고 구축된 플라스미드를 대장균에 형질전환시켜 IPTG 유도제로 단백질을 발현시켰다. 대장균의 최적 배양조건을 검토하기 위하여 IPTG 유도 후 20°C와 37°C에서 20시간 배양한 결과, Fig. 3과 같이 β -콩글리시닌의 β -서브유닛이 균체 총 단백질의 20% 정도 발현되었다. (Fig. 3 Lane 1) 일반적으로 대장균에서 효율 좋게 과잉으로 발현된 이종 유전자 산물은 균체내에 과립상의 inclusion body를 형성한다²¹⁾. 즉 진핵생물 유래의 외래유전자를 대장균에서 높게 발현시키면 주종의 단백질이 균체내에 응집하고 생리적으로 불활성인 봉입체를 형성한다. 이 봉입체 형성은 생성된 단백질이 균체내의 단백질 가수분해의 작용을 받지않기 위함이다²²⁾. 그러나 균체 유래의 가용성 단백질로부터 목적의 유전자 산물을 용이하게 분리시킬 수 있는 등 장점도 있다. 불용화 봉입체로부터

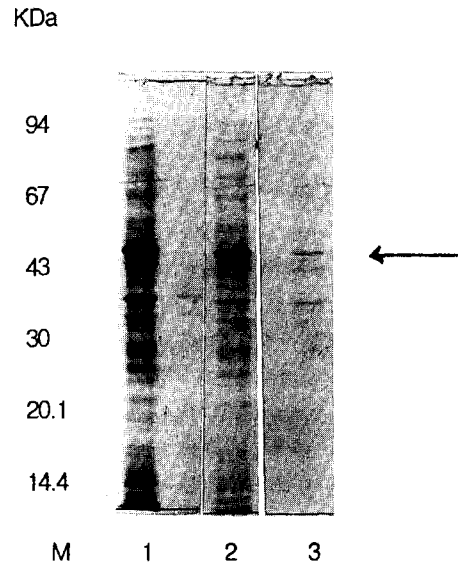


Fig. 3. High level expression of β -conglycinin β -subunit. A 11% SDS-polyacrylamide gel is shown displaying the total proteins of *E. coli* strain BL21 (DE3) : Lane M. The total weight markers. 1. The total proteins of *E. coli*. 2. The soluble proteins of *E. coli*. 3. The insoluble proteins of *E. coli*. The arrow indicates the position of β -conglycinin β -subunit. The numbers on the left denote molecular weights of the markers.

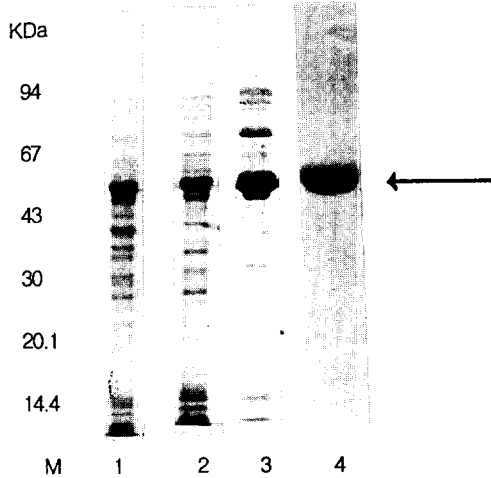


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of β -conglycinin β -subunit at difference stages of purification. Lane M, molecular weight of markers : Lane 1, crude extract of induced *E. coli* cells : Lane 2, fraction with 20~40% saturation of ammonium sulfate : Lane 3, Q-Sepharose pool : Lane 4, Butyltoyopearl pool. The arrow indicates the position of β -conglycinin β -subunit. The numbers on the left denote molecular weights of markers.

생리활성을 발현하는 목적단백질이 되려면 입체구조 재생(refolding)이 필요하다²³⁾. 발현 단백질이 가용성 상태인지, 불용성 상태인 봉입체로 축적될지 조사한 결과 발현된 단백질은 Fig. 3처럼 90% 이상 가용화되었다. (Fig. 3 Lane 2) 즉 발현시킨 대장균을 회수, 파쇄하고 원심분리하여 상정액과 침전으로 나누고 SDS-PAGE로 분석한 바 β -콘글리시닌의 β -서브유니트는 상정액에 90% 이상 존재하였다. 따라서 β -서브유니트는 가용성의 상태로 축적하고 있는 것을 알 수 있다. 또한 온도에 따른 발현량의 변화는 예민하지 않았지만 용해성은 민감하였다. 즉 저온에서 발현시킨 경우 용해성이 높았다.

3. 발현단백질의 정제 및 특성

발현된 단백질을 Fig. 1같이 정제하여 Fig. 4의 결과를 얻었다. 먼저 발현시킨 대장균(Fig. 4 lane 1)을 파쇄하고 원심분리하여 상정액을 얻었다. 상정액을 20~40% 황산암모늄으로 분별침전하고(Fig. 4 lane 2) 35mM sodium phosphate 완충액(pH 8.0)으로 0.1M에서 0.4M까지 NaCl의 농도 기울기로 Q-Sepharose 이온교환 크로마토그래피하였다. (Fig. 4 lane 3)

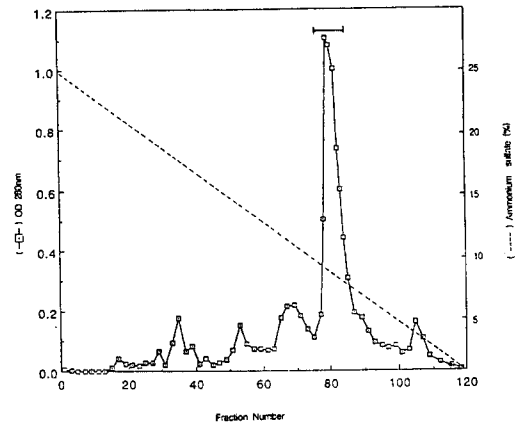


Fig. 5. Purification of β -conglycinin β -subunit by a Butyltoyopearl column chromatography. The protein content of each fraction was measured by spectrophotometer at 280nm. The bar indicates the column fractions that were pooled. The samples of selected fractions were analyzed by SDS-PAGE on 11% gels.

다음 Butyltoyopearl로 소수성 컬럼 크로마토그래피한 결과(Fig. 4 lane 4, Fig. 5) SDS-PAGE상 균일한 것으로 확인되었다. (Fig. 4 lane 4) 또한 단백질의 N-말단 아미노산 배열을 분석한 바 cDNA로부터 예상된 배열과 일치하였다. 그러나 N-말단에 메티오닌이 부가되어 있었다. 이는 대장균을 숙주로 하여 과잉 생산된 목적단백질의 N-말단에 종종 번역 개시시에 부가된 메티오닌잔기가 제거되지 않고 잔존하기 때문이다²⁴⁾.

한편 대장균에서 발현된 β -서브유니트가 콩속에서와 마찬가지로 트리머로 회합하고 있는지 검토하였다. 대장균을 파쇄, 추출액을 설탕밀도기울기 원심분리하여 SDS-PAGE로 분석한 결과 트리머의 크기를 나타냈다. 따라서 대장균에서 발현시킨 β -서브유니트는 천연의 β -콘글리시닌과 마찬가지로 트리머를 형성하고 있는 것으로 확인되었다. 결국 발현된 단백질이 고차구조형성력을 가진 것으로 확인되었다^{25,26)}.

요 약

콩단백질은 글리시닌과 β -콘글리시닌을 주요 성분으로 한다. 영양성 및 가공 특성을 개선하기 위하여 유전자공학적 방법을 시도하였다. 즉 β -콘글리시닌의 β -서브유니트를 유전자 클로닝하고 대장균에서 발현시켰다. 발현백타는 pET 21d 이며 플라스미드를 구축하여 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켰다. 발현된 단백질

은 균체 전체 단백질의 20%이며 가용화 상태로 축적되었다. 축적 발현단백질은 천연의 β -콘글리시닌과 동일항 트리머로 확인되었다. 정제는 황산암모늄 20~40% 분별침전, Q-Sepharose 이온교환크로마토그래피, Butyltoyopearl 소수성 컬럼크로마토그래피로 하였다.

이것은 콩단백질의 특성을 규명하는데 필요한 대장균 대량 발현계를 확립하고 발현단백질의 정제방법을 확립한 결과이다.

참고문헌

- Pimental, D. and Pimental, M., Food protein production: land, energy and economics, AVI. publishing(1979).
- Kinsella, J. E., Damodaran, S and German, B., Physicochemical and functional properties of oil seed proteins with emphasis on soy proteins. In "New protein Foods. Vol 5. Seed Storage proteins". A. M Itschul and H. L. wilcke eds.) pp.107-179, Academic press, Orlando, Florida, USA (1985).
- Gurr, M. I., "Role of Fats in Food and Nutrition" Elsevier, London (1984).
- Watanabe, K., Dietary cholesterol and human health *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 830-837 (1990).
- Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T. and Kimoto, M., Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats, *J. Nutr.*, 120, 77-85 (1990).
- Utsumi, S., Plant Food Protein Engineering, Advances in Food and Nutrition Research, 36, 89-208 (1992).
- Kim, C.-S., Kamiya, S., Sato, T., Utsumi, S. and Kito, M., Improvement of nutritional value and functional properties of soybean glycinin by protein engineering. *Protein Engineering* 3, 725-731 (1990).
- Utsumi, S. and Kito, M., Improvement of Food Protein Function by chemical, physical and biological modifications Comments Agric. and Food Chemistry, 2, 261-278 (1991).
- Utsumi, S., Gidamis, A. B., Kanamor, I., Kang, I.-J. and Kito, M., Effects of Deletion of Disulfide Bonds by protein engineering on the conformation and functional properties of soybean proglycinin, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 687-691 (1993).
- Utsumi, S., Gidamis, A. B., Mikami, B. and Kito, M., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the soybean proglycinin Expressed in *Escheichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 233, 177-178 (1993).
- Bray, A., Naito, S., Pan, N.-S., Anderson, E., Dube, P and Beachy, R. N. Expression of the β -subunit of β -conglycinin in seeds of transgenic plants. *Planta* 172, 364-370. (1987).
- Sebastiani, F. L., Farrell, L. B., Schuler, M. A. and Beachy, R. N. Complete sequence of a cDNA of α subunit of soybean β -conglycinin, *Plant molecular Biology*, 15, 197-201 (1990).
- Ogawki, T., Tsuji, H., Bando, N., Kitamura, K., Ihu, Y.-L., Hirano, H. and Nishikawa, K. Identification of the soybean Allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-KDa oil-body-associated protein, *Biosci. Biotech. Biochem*, 57, 1030-1033 (1993).
- Ogawa, T., Bando, N., Tsuji, H., Nishikawa, K. and Kitamura, K. α -Subunit of β -conglycinin, an Allergenic protein recognized by IgE Antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 831-833 (1995).
- Okayama, H and Berg, D., High-efficiency cloning of full-length cDNA, *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170 (1982).
- Kagawa, H and Hirano, H., Sequence of a cDNA encoding soybean basic 7S globulin, *Nucleic acids Research*, 17(21), 8262, (1989).
- Harada, J. J. Barker, S. T. and Goldberg, R. B., Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and post transcriptional processes, *Plant Cell*, 1, 415-425 (1989).
- Doyle, J. J., Schuler, M. A., Godette, W. D., Zenger, V., Beachy, R. N. and Slightom, J. L., The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*, *J. Biol. Chem.*, 261, 9228-9238 (1986).
- Laemmli, U. K., Cleavage of Structural proteins during assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
- Kamitri, S., Hiritsu, K., Hiritsu, T., Kond, K., Inoue, K., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Higuchi, Y., Yasuoka, N., Kusunoki, M., Matsuura, Y. *J. Biochem.* 101, 813 (1987).
- Ikeuchi, T., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., *Eur. J. Biochem.*, 167, 233 (1987).
- Goeddel, D. V., Heyneker, H. C., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R., Seeburg, P. H. *Nature*, 281, 544, (1979).
- 新生物學 實驗講座, 蛋白質VI, 合成 および 發現. 東京化學同人 (1992).
- 新生物學 實驗講座, 蛋白質VII, 蛋白質工學 東京化學同人 (1992).
- 蛋白質工學(應用化學講座11), 油谷克英. 中村春木, 朝倉書店(1991).