

# 유지방구막(Milk Fat Globule Membrane, MFGM)의 구성 단백질에 대한 최근의 연구

황보 식

우쓰노미야대학 농과대학

## Recently Studies of the Constituent Proteins from Milk Fat Globule Membrane

S. Hwangbo

College of Agriculture, Utsunomiya University

### I. 서 론

유선의 세포내에서 합성된 지방방울은 정단 세포막 쪽으로 운반되어, 거기서 정단세포막에 의해 피복되어 세포밖으로 분비되며 유지방구를 피복하고 있는 유지방구막(milk fat globule membrane, 이하 MFGM이라 함)에 관한 연구가 매년 축적되어 왔다.<sup>(1-5)</sup> 특히 세포막의 세포밖으로의 이출현상은 생물계에서도 유선에서만 볼 수 있는 현상이다. Holstein의 우유를 기준으로 생각할 경우 유지방 1g의 표면적은 2 m<sup>2</sup>나 된다. 유지방울을 약 3.3%로 계산할 경우, 우유를 하루 평균 25 kg 비유하는 소의 경우 하루 1,650 m<sup>2</sup>의 세포막이 이출하는 것이 되며, 유선세포에서 그 보수기구가 준비되어 있다고 하더라도, 유분비에 의한 모체가 받는 에너지의 요구는 막대한 것이 된다.<sup>(6)</sup> 이 세포막이 지방구를 피복하고 있음으로써, 지방과 물의 계면을 형성하여 지방을 분산하는 기능을 갖고 있음은 물론이고, 신생동물의 식물로서 많은 미지의 기능을 갖고 있음이 추측된다.

여기서는, MFGM의 조성 및 구조에 대해 잠시 언급한 후 MFGM의 기능에 대해 설명하고자 한다. 또한 최근에 행해지고 있는 MFGM의 구성성분

중 특히 당단백질에 대해 설명하고자 한다.

### II. MFGM의 조성

정제한 MFGM은 약 45%의 단백질과 약 55%의 지질로 구성되어 있는 구조 lipoproteins이다. MFGM의 단백질과 지질의 함량은 그 조제법, 특히 유지방구를 물리적으로 파괴할 때, MFGM에 결합되어 있는 triacylglycerol (TG)의 양에 의해 변동한다. 따라서 churning에 의해 조제한 MFGM의 TG는 전 지질의 약 60% (50~85%)를 차지하고 있으며, 27% (24~40%)의 phospholipids, 3%의 cholesterol이 함유되어 있으며, 그 밖에 미량의 당지질 등이 함유되어 있다. 인지질은 phosphatidyl choline (27%), phosphatidyl ethanolamine (33%), sphingomyelin (23%), phosphatidyl serine (8%), phosphatidyl inositol (7%)등으로 구성되어 있다. 당지질의 경우, GD3 (disialohematoside)이 67%를 차지하고 있다.<sup>(6, 7)</sup>

MFGM의 구성 단백질은 4~30% acrylamide 농도 균배에 의해 SDS존재하에서의 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 분자량 13,000~210,000의 약 42개의 폴리 펩티드로 구성되어 있는 것이 확인되었다. 그 중 중요한 펩티드는, 단백질 염색에

의해 16개의 펩티드(CB-1~CB-16), 당 염색에 의해 7개의 펩티드(PAS-1~PAS-7)가 검출되는 것이 확인되었다<sup>(8-14)</sup>.

### III. MFGM의 구성 단백질

MFGM의 화학조성 및 인지질 조성을 정리하여 Table 1에 나타내었다. 유지방 100g 당 0.5~1.5 g의 MFGM이 얻어진다. MFGM의 90% 이상이 단백질과 지질이다. 시료에 의해 화학조성에 변동이 보이는 것은 물론 계절, 비유기 등의 생리적·환경적 요인 외에 우유, cream의 신선도, 처리법 및 MFGM의 조제법에 기인한다. MFGM의 특징 중의 하나로 인지질중에 sphingo 인지질이 많이

함유되어 있는 것이다.

MFGM의 구성단백질에 대한 통일된 명명은 없으며, 검출되는 band의 이동도가 작은 순으로 번호가 붙여져 있다, 우유의 MFGM의 구성 단백질 중 당 peptide중 PAS-1, -2, -3은 단백질 염색 (Comaasia brilliant blue R-250, CB)에 의해 잘 검출되지 않으며(Fig. 1) PAS-4, -5, -6 그리고 PAS-7은 CB에서도 용이하게 검출된다.

SDS-PAGE법에 의해 얻어진 폴리 펩티드의 분자량은 각 연구자에 의해 차이가 있다.<sup>(10-16)</sup> Sugar chain(당쇄)를 갖고 있지 않은 CB-1의 경우만 하더라도 169,000~132,000으로 그 폭이 매우 넓은 것이 보고되어 있다. Glycopeptides의 경우, 그 당쇄에 의한 장애, 당쇄에 SDS가 결합하지 않는

Table 1. Gross composition of bovine milk fat globule membrane

	Ranges	Average	Units
Protein*	33 ~ 57	44.1	%
Lipid*	43 ~ 68	55.3	%
Phospholipid**	24 ~ 40	26.7	%
Phosphatidyl choline***	25.7~42.9	32.9	%
Phosphatidyl ethanolamine***	22.3~39.8	30.7	%
Phosphatidyl serine***	2.0~14.0	7.8	%
Phosphatidyl inositol***	2.0~11.1	6.7	%
Spingomyelin***	19.0~35.5	22.8	%
Lyso-phospholipids***	0.6~ 2.6	1.1	%
Cholesterol**	1.5~ 5.9	3.6	%
Glycerides**b	50 ~ 85	69.2	%
Free fatty acid**		6.3	%
Hydrocarbon**		1.2	%
Cerebrosides*		3.5	nm
Gangliosides*		6	nm
Hexoses**	0.032~0.154	0.078	mg
Hexosamines**	0.009~0.129	0.012	mg
Sialic acid**	0.007~0.055	0.020	mg

b: Including mono- and tri-glycerides, \*: % of total milk fat globule membrane, \*\*: % of total lipid, \*\*\*: % of total phospholipid, \*: n mol per mg protein, \*\*: mg per mg protein, I apologize to readers and reporters that I did not list up references cited here.

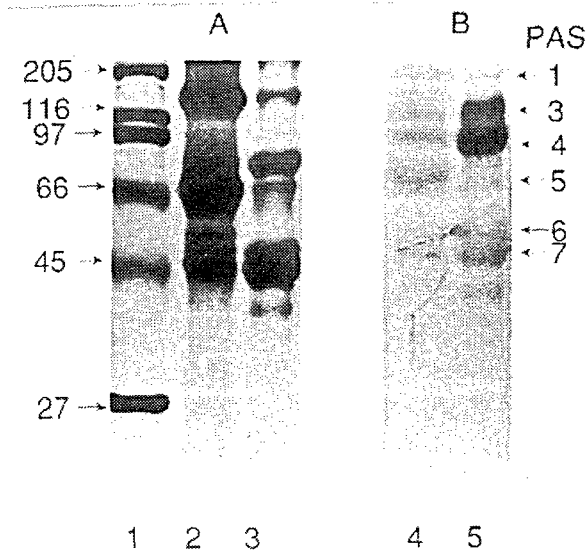


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of MFGM proteins.

MFGM was separated by SDS-PAGE (10%) under reducing conditions. Lanes 1, protein marker; 2 and 4, MFGM; 3 and 5, Triton X-114 solubilized fraction from MFGM. A was stained with coomassie brilliant blue R-250 (CB) and glycoprotein (B) with periodic acid-Schiff reagent (PAS).

것, 표준이 되는 적절한 당단백질이 없는 것 등의 이유로 정확한 분자량을 계산하는 것이 어려운 실정이다.

MFGM의 구성단백질의 아미노산 함량을 보면, Glu이 제일 많으며, 그 다음으로 Asp, Lue 및 Ser 등을 다량 함유하고 있으나 술통 아미노산의 함량은 매우 적다. 산성아미노산에 대한 염기성 아미노산의 mol%에 대한 비율은 약 1.6으로 MFGM의 단백질을 전체적으로 산성을 나타내고 있다. 등전점 전기영동에 의하면, MFGM 단백질은 pH 5~9의 사이에 분포되어 있다<sup>(17, 18)</sup>. 생체막의 구성 단백질은 그 구성상 다소 소수성 아미노산을 많이 갖고 있는 특징을 나타내고 있으며, MFGM의 경우도 예외는 아니었다. MFGM의 구성단백질에 대한 연구는 많이 진행되어 왔다<sup>(9-14, 19-23)</sup>. PAS-1 (Mr 210,000), PAS-2 (Mr 96,000), PAS-3 (Mr 90,000)의 glycopeptides는 CB에 의해 검출되지 않는다. PAS-4 (Mr 75,000~85,000), PAS-5 (Mr 67,000~75,000), PAS-6 (Mr 53,000~59,000), PAS-7 (Mr 48,000~55,000)은

CB 및 당염색제인 periodic acid-shiff reagent (PAS)에 의해 염색된다. 이중, PAS-6 및 PAS-7는 매우 유의한 분자량을 갖고 있지만, Concanavalin A에 대한 친화성의 차이를 이용하여 구별하는 것이 가능하다<sup>(23)</sup>.

#### IV. 지방구 및 MFGM의 형태

유선세포로부터 lumen에 분비된 직후의 대부분의 지방구는 8~12mm의 2중막에 피복되어 있다. 그러나, 분비 후 시간의 경과와 함께 지방구를 피복하고 있는 2중막은 점점 없어져, 이것보다 조금 더 폭이 넓어진 한겹의 막이 되는 것이 여러 연구자에 의해 관찰되었다<sup>(24-26)</sup>. Wooding<sup>(24)</sup>에 의하면, 착유직후의 유의지방구는 Core 지질을 피복하고 있는 무구조로 3~5 nm의 막이 있으며, 그 바깥쪽에 세포막 유래의 8~10 nm의 2중막이 있어, 이 2중막은 전자밀도가 높은 입자상의 물결(10~25 nm)이 존재하고 있음을 보고하였다. 분비 후 시간이 경과한 지방구에서도 대부분의 제1의 MF-

GM이 입자상의 물질과 함께 소포를 형성함으로써 유선선포강에 방출된다. 따라서 시간이 경과한 지방구는 일부분은 제1차 MFGM이 존재하고 있으며, 그 밖에도 무구조의 제2차 MFGM에 의해 피복되어지는 것을 밝혔다.

세포내의 지방방울은, 막모양의 물질에 의해 피복되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 또 Baner<sup>(26)</sup>에 의해 단층의 막모양의 물질이 존재하는 것이, 지방 방울 쪽의 무구조의 막과 2중막의 사이에 casein micell이 우연히 삽입되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 2B). 이러한 것을 Wooding의 제1차 및 제2차 MFGM에 상응하는 것이라 생각되어진다.

지방방울을 둘러싸고 있는 세포막(MFGM)의

대부분은 2중막의 구조를 유지하고 있으나, 일부는 무구조가 되어 유지방구로부터 이탈한다. 이것을 분비후 세포내의 지방방울의 표층에 있는 인지질층과 세포막의 안쪽에 있는 인지질 층이 융합하여 피복물질이 과잉한 상태가 되므로, 막을 구성하고 있는 성분이 재배열되기 때문에 일부분은 2중막을 유지하고 있으나, 일부는 무구조의 막이 되어 지방구조로부터 이탈하게 된다. 이탈한 막획분을 초원심분리에 의해 casein micell에 분획되어 skim milk 막획분으로 분리된다.

Fig. 3을 MFGM의 주요 구성성분의 하나인 PAS-4의 분포를 나타낸 것이다<sup>(4)</sup>. PAS-4에 대한 항체를 이용하여 조직 염색한 결과 분비상피세포

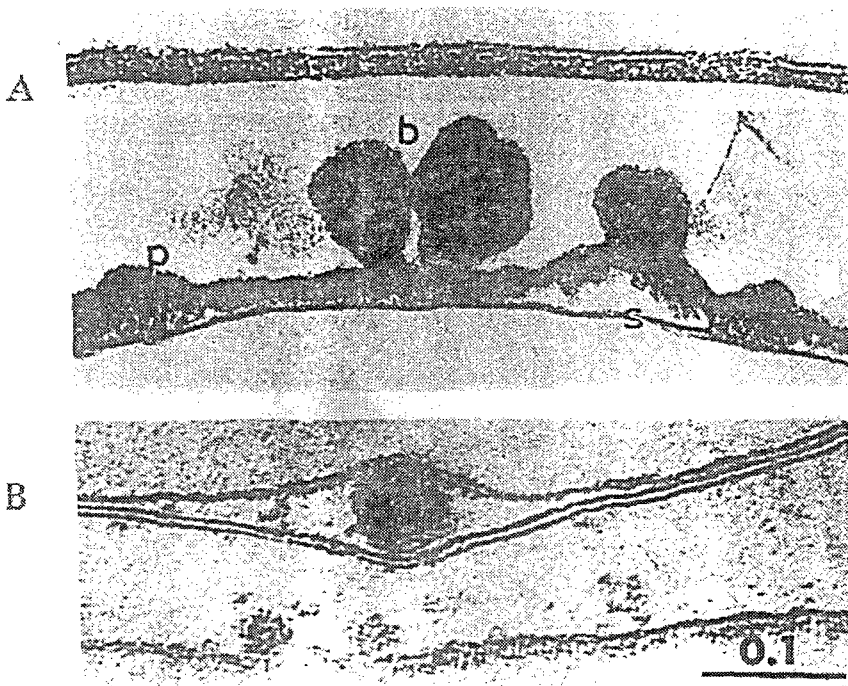


Fig. 2. Ultrastructure appearances of milk fat globule membrane.

A; Thin-sectioned views of milkfat globule membrane. 1, Uniformly thick primary milkfat globule membrane is indistinguishable from the secondary milk fat globule membrane.  $\times 26,000$ . 2, The primary milk fat globule membrane (P) has formed blebs (b) and the secondary milk fat globule membrane (S) is visible.  $\times 100,000$ .

B; Detail view cross sectioned unit membrane surrounding a fat globule. The casein micelle is probably incidentally sandwiched between the unit membrane and the first membrane like material adhering core lipid.  $\times 200,000$ .

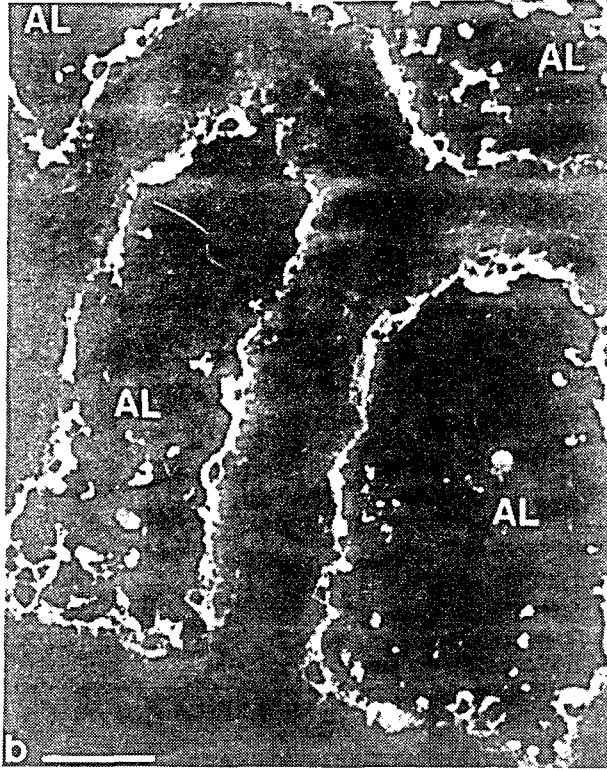


Fig. 3. Localization of PAS-4 in lactating bovine mammary gland.

Indirect immunofluorescence of frozen sections with antibodies to PAS-4. Staining with antibodies to PAS-4 is restricted to apical regions of these cells and to the surfaces of milk fat globules, some of which are seen free in the alveolar lumina (AL). Bar=20  $\mu$ m.

쪽이 강하게 염색되어지는 것이 확인되었다. AL 쪽에 염색되어지는 것으로 볼 때, 지방구가 분비 될 때 정단세포막을 둘러싸고 유출되는 하나의 증거로 이해되리라 생각한다.

## V. MFGM의 기능

지금까지의 MFGM에 관한 연구는 MFGM의 기호와 특성, 구조에 중점을 두고 연구되어져 왔으나, MFGM의 기능, 이용의 연구에 중점을 둔 연구가 활발하게 진행되기 시작하고 있다. 지금까지 알려진 MFGM의 중요한 기능에 대해 요약하면 다음과 같다.

### 1. Lipase에 대한 저해작용

우유에는 여러 가지 lipase가 존재하는 것이 알려져 왔으나, Hernell과 Olivecrona 등의 연구<sup>(27)</sup>에 의해 우유에는 lipoproteia lipase(LPL) 한가지만이 존재하고 있는 것이 밝혀졌다. 모유의 LPL은 우유의 LPL의 항체와 교차반응을 하는 것이 알려져 있다<sup>(33)</sup>. 미처리의 유지방구가 파괴되어 있지 않은 우유에서의 lipolysis는 전혀 일어나지 않지만, 우유를 2분간 초음파 처리하여 유지방구를 파괴할 경우 lipolysis가 크게 일어난다. 즉 MFGM은 LPL의 작용에 대해 이 효소가 직접 우

유지방구에 결합하는 것을 방지하는 물질이 존재하며, 이 물질에 의해 lipolysis를 막을 수 있게 되어 있으리라 생각된다(Fig. 4).

## 2. Riboflavin의 흡수에 대한 MFGM의 영양 기능

우유에는 vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin, RF)가 많이 함유되어 있는 식품으로, 전 RF의 양은 우유 100g 당 182.9±21.8 μg으로 탈지유획분에 약 60%가 분포되어 있다. 한편, 결합형 RF도 존재하며, 그 함량은 우유의 총 RF의 약 13%를 차지하고 있으며, 그중 세포막 유대의 획분에 결합형 RF가 90%를 차지하고 있다. 결합형 flavin은 FAD, FMN, RF이며, 이 RF와 단백질과의 결합은 주로 소수결합을 형성하고 있다<sup>(29)</sup>.

Mouse를 이용한 *in vivo*의 연구에 의해, MFGM투여 초기에 RF의 흡수를 촉진하는 것이 밝혀졌다<sup>(29)</sup>. 또한, MFGM이 장관림막에 대하여 RF의 흡수를 위한 signal peptide로써 작용한다고 생각할 때 RF의 흡수촉진은 RF를 결합하고 있는 단백질에 의한 것인가, 그렇지 않으면, 그밖의 MFGM 단백질에 의한 것인가는 계속 연구를 진

행해야 할 과제로 남아 있다.

## 3. 유지방구의 재구성에 의한 MFGM의 유화기능

MFGM은 유지방구를 피복하여 유지방구를 유체에 분산시켜 안전한 에멀전을 유지시키고 있다. 이것은 MFGM의 본래의 기능의 하나로써 MFGM이 유지방구의 유화에 그 기능을 발휘하고 있음을 시사시켜준다. MFGM과 유지방으로부터 유지방구를 재구성하므로써 MFGM의 유화기능을 실험하였다. 그 결과, 재구성된 유지방구는 1.4~8 μm의 범위를 나타내었으며, 1.4~3 μm의 유지방이 전체의 70%를 차지하고 있었다. 재구성의 조건에 따라 다소 차이가 있으나, 이것은 천연의 유지방구 크기에 가깝게 재구성된다는 것이 밝혀졌다<sup>(6)</sup>. 이와 같이 MFGM과 유지방구를 pH 7, 45°C에서 균질기로 1분간 처리함으로써 matrix로써 흡착되어지는 MFGM의 양이 천연의 크림에 필적하는 MFGM의 양, 즉 지방의 20mg/g 이상의 농도에서 매우 우수한 유화특성을 갖는 0지방구를 재구성하는 것이 가능하다. MFGM이 갖는 본래의 유화특성이 유지방구를 재구성함으로써

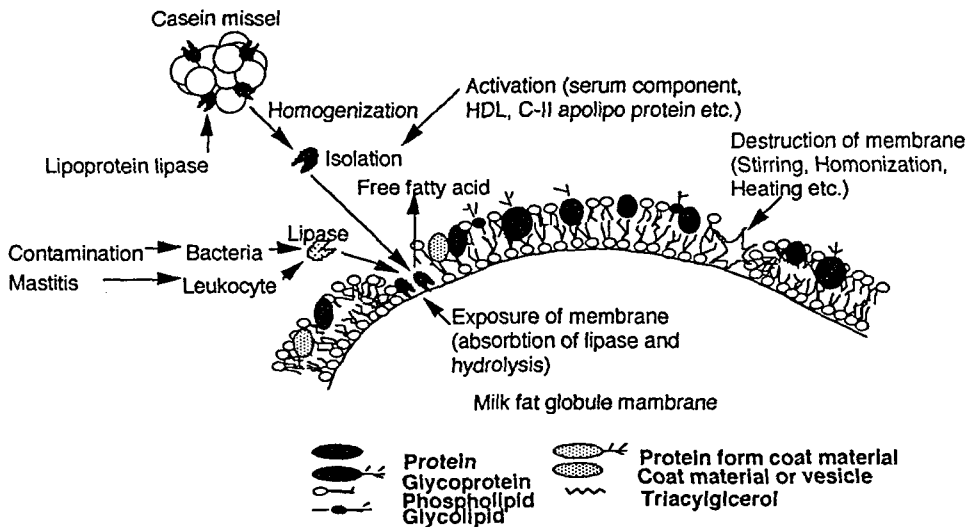


Fig. 4. Factor of lipolysis in milk.

증명되었다고 할 수 있다.

#### 4. Liposomes로서의 기능

Liposomes으로서의 기능은 MFGM이 본래 갖고 있는 기능은 아니지만, MFGM은 (1) 여러 가

지의 지질로 구성되어 있는 것, (2) 단백질을 재구성하는 것, (3) 많은 양의 지질을 둘러쌀 수 있는 점, (4) pH 4.9에서 등전침전을 하는 등의 성질을 갖고 있는 것이 밝혀져 있어 인지질을 주체로 하여 조제한 liposome은 proteoliposomes으로써 특정의 목적을 위해 특수한 수용성 또는 지용성의

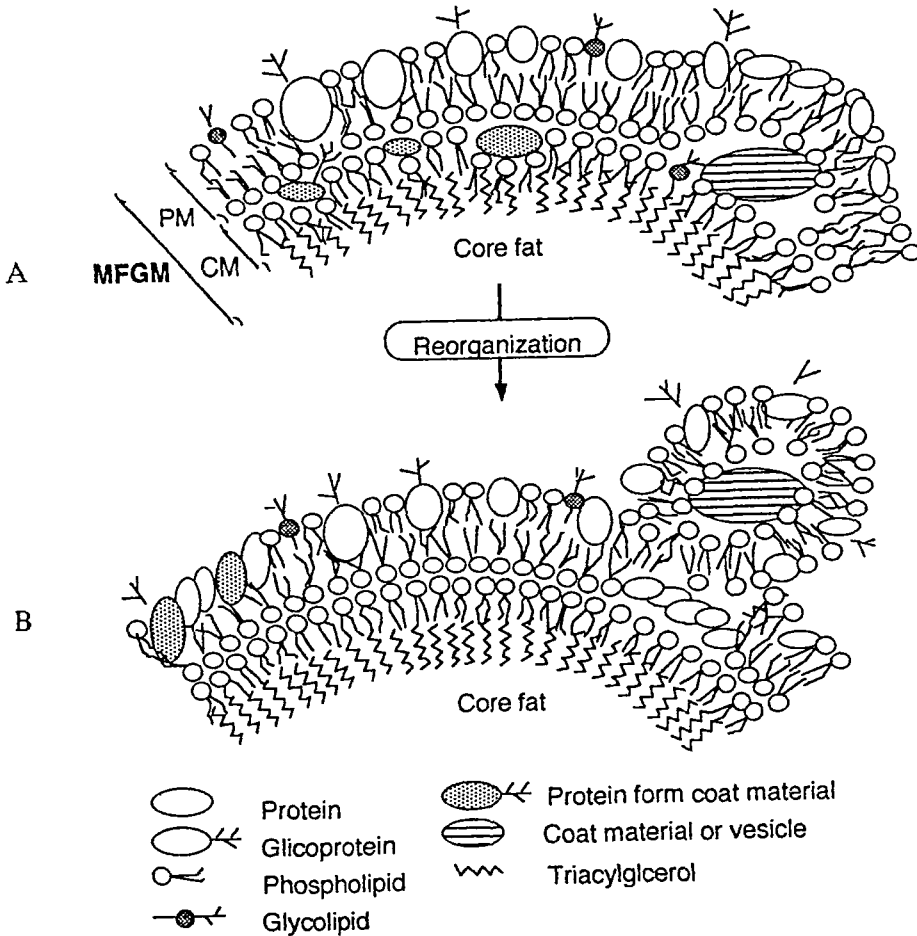


Fig. 5. Hypothetical model proposed for the principal structure of milkfat globule membrane (MFGM) just after secretion and after reorganization of bovine milk globule (MFG). MFGM enveloping MFG is basically composed of an inner coated membrane and outer plasma membrane (PM). Intracellular lipid droplets (ILD) is coated with a coat membrane CM. Membrane components are asymmetrically distributed, and the moieties of the sugar chain in glycoproteins are exposed on the outer surface. For reorganization, the outer PM fuses with the inner coated membrane of MFG. The components of both membranes are transformed by lateral movement. Especially, the sugar chain of glycoproteins in the inner membrane is exposed on the outer aqueous surface, while apolar moieties interact with the phospholipid bilayer.

물질을 운반체로서 이용 가능하리라 생각된다. 최근 인슐린의 운반체로 활용가능한 것이 밝혀져 흥미진진한 연구자료로서 주목을 받기 시작하고 있다.

## VI. 맺음말

유선세포로 막대한 양의 유지방방울을 피복하기 위해 소비되는 세포막을 계속해서 보수하기 위한 합리적인 기구를 갖고 있으리라 생각된다. 따라서 MFGM의 기원과 세포내의 각 Organelle에서의 막의 흐름은 소포체→골지체→분비소포→세포막→MFGM의 흐름이 제안되어 있다<sup>(14, 30)</sup>. 즉, 분비직후의 지방구로 core fat를 둘러싸고 있는 막 모양의 물질과 세포막으로 된 약 8~12mm의 2중막으로 피복되어 있으나, 분비후 시간의 경과와 함께 일부는 무구조가 되어 막으로 부터 이탈한다 (Fig. 5a). 그러나 대부분의 2중막은 세포질내의 지방구의 표층에 있던 인지질층과 세포막이 융합하여 막을 구성하는 성분이 재배열함으로써 지방구는 안정한 상태가 된다(Fig. 5b). 이와 같이 MFGM의 구조에 대한 연구와 함께 구성성분의 기능을 밝힘으로서 보다 폭넓은 MFGM의 기능 및 그 이용가치가 밝혀지리라 생각한다. 이후 MFGM의 주요 구성성분의 하나인 PAS-4에 대한 연구를 소개해 나갈 생각이다.

## VII. 참고문헌

1. Patton, S. and T. W. Keenan. 1975. Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 273.
2. Kanno, C. 1980. Isolation and physico-chemical properties of a soluble glycoprotein fraction of milk fat globule membrane. *Jpn. J. Zootch. Sci.* 51, 75.
3. Franke, W. W., H. W. Heid, C. Grund, S. Winter, C. Freudenstein, E. Schmidt, E. D. Jarasch and T. W. Keenan. 1981. Anti-
4. bodies to the major insoluble milk fat globule membrane-associated protein; specific location in apical regions of lactating epithelial cells. *J. Cell Biol.* 89, 485.
5. Kanno, C. 1990. Secretory membrane of the lactating mammary gland. *Protoplasma* 159, 184.
6. Mather, I. H. and L. J. W. Jack. 1993. A review of the molecular and cellular biology of butyrophilin, the major protein of bovine milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 76, 3832.
7. Kanno, C. 1988. Function of milk fat globule membrane. *Jap. J. Dairy and Food Sci.* 37, 241.
8. Takamizawa, K., M. Iwamori, M. Mutani and Y. Nagai. 1986. Lipid components of milk fat globule membrane. *J. Biol. Chem.*, 261, 5625.
9. Kanno, C. 1986. Receptor proteins for concanavalin A and wheat germ agglutinin of bovine milk fat globule membrane probed by affinity chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2997.
10. Anderson, M., G. C. Cheeseman, D. J. Knight and W. F. Shipe. 1972. Location of proteins within the milkfat globule membrane. *J. Dairy Res.*, 39, 95.
11. Kobylka, D. and K. L. Carraway. 1974. Proteins and glycoproteins of the milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 288, 282.
12. Mather, I. H. and T. W. Keenan. 1975. Studies on the structure of milk fat globule membrane. *J. Membrane Biol.*, 21, 65.
13. Mangino, M. E. and J. R. J. Brunner. Molecular weight profile of fat globule membrane proteins. *J. Dairy Sci.*, 58, 313.
14. Shimizu, M., C. Kanno and K. Yamauchi.



1976. Dissociation of the soluble glycoprotein of bovine milk fat globule membrane by sodium dodecyl sulfate. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1711.
14. Hwangbo, S. 1995. Biochemical and molecular biological studies on PAS-4 glycoprotein of milk fat globule membrane. Ph. D. thesis, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.
  15. Anderson, M., T. E. Cawston and G. C. Cheeseman. 1974. Molecular-weight estimate of milk-fat-globule-membrane protein-sodium dodecyl complexes by electrophoresis in gradient acrylamide gels. *Biochem. J.*, 139, 653.
  16. Diaz-Maurino, T. and M. J. Mieto. 1976. Milk fat globule membranes; Chemical composition and phosphoesterase activities during lactation. *Dairy Res.*, 44, 483.
  17. Singh, S. and N. C. N. Ganguli. 1976. Identification and characterization of the principal proteins of the fat-globule membrane. *Dairy Res.*, 43, 381.
  18. Mather, I. H. 1978. Separation of the proteins of bovine milk fat globule membrane by electrofocusing with retention of enzymatic and immunological activity. *Biochem. Biophys. Acta*, 514, 25.
  19. Valivullah, H. M. and T. W. Kennan. 1989. Butyrophilin of milk fat lipid globule membrane contains N-linked carbohydrates and cross-linked with xanthine oxidase. *Int. J. Biochem.*, 21, 103.
  20. Anderson, M. and T. E. Cawston. 1975. Reviews of the progress of dairy science, The milk-fat globule membrane. *J. Dairy Res.*, 42, 459.
  21. Brunner, J. R., F. C. Swope and R. L. Carrol. 1969. Structure of the milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 52, 1092.
  22. Johnson, V. G. and I. H. Mather. 1985. Monoclonal antibodies prepared against PAS-1, Butyrophilin and GP-55 from guinea-pig milk-fat-globule membrane bind specifically to the apical pole of secretory-epithelial cells in lactating mammary tissue. *Exp. Cell Rea.*, 158, 144.
  23. Kim, D. H., C. Kanno and Y. Mizokami. 1992. Purification and characterization of major glycoproteins, PAS-6 and PAS-7, from bovine milk fat globule membrane, *Biochem. et biophys. Acta*, 1122, 203.
  24. Wooding, F. B. P. 1971. The structure of the milk fat globule membrane. *J. Ultrastruc. Res.*, 37, 388.
  25. Wooding, F. B. P. and P. Kemp. 1975. High-melting-point triglycerides and the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Res.*, 42, 419.
  26. Bauer, H. 1975. Presence of marker enzymes for plasma membrane. *J. Dairy Sci*, 55, 1375.
  27. Hernell, O. and T. J. Olivecrona. 1974. Enzymic characterization of fat globule membranes from bovine colostrum and bovine normal milk. *Lipid Res.*, 15, 367.
  28. Bengtsson, G. and T. Olivercrona. 1982. A comparative study of the lipids of globule membrane and fat core and of the milk in cows. *FEBS Lett.*, 147, 183.
  29. Keenan, T. W., D. J. Morre and C. M. Huang. 1974. In *Lactation*, vol. 2(Larson, B. L., V. R. Smithed), Academic Press, New York and London, 191.
  30. Kanno, C. and M. Kanehara. 1985. Function of riboflavin from milk fat globule membrane. *日本農芸化学會大會講演要旨集*, 59, 718.