

콩 유용성분 탐색에 관한 연구: 콩 Ferritin의 정제 및 특성

오석홍* · 서경원¹

우석대학교 생물공학과, ¹우석대학교 대학원 생명공학과

초 록 : 콩 유용성분 탐색의 일환으로 그리고 향후 콩 ferritin 항체 및 유전자 확보를 목표로 발아된 콩으로 부터 ferritin을 분리 정제하여 그 몇가지 특성을 조사하였다. 72시간 발아된 콩으로부터 ammonium sulfate 침전(0.55 saturation), DEAE-cellulose, Sephacryl S-300, Bio-Scale Q2 column chromatographies를 통하여 ferritin을 분리하였다. 정제된 콩 ferritin은 SDS-PAGE 분석에서 21 kDa의 크기를 나타냈으며, Sephacryl S-300을 통한 겔거르기 chromatography와 non-denaturing 폴리아크릴아마이드 전기영동 분석에서 510~560 kDa의 크기로 추정 되었다. 또한, immunodiffusion test에서 anti-soybean ferritin antiserum과 상호 반응하였다. 원자흡광도계와 표준 철 용액을 이용한 정제된 콩 ferritin 중의 철 함유량은 833 mol Fe/mol protein 이었으며, 이는 호박씨로부터 분리한 ferritin보다 31배 더 많은 양의 철 함유량 이었다. 정제된 콩 ferritin중의 철은 horse spleen ferritin 중의 철과 유사하게 iron staining 되었다.(1998년 10월 27일 접수, 1998년 11월 11일 수리)

서 론

콩과 호박씨는 식물중 철을 가장 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 철이 풍부해 철 저장 단백질의 발현량도 매우 많을 것으로 여겨진다. Ferritin은 24개의 소단위 펩티드가 결합하여 하나의 거대한 단백질 shell을 형성하여 철을 다량 저장 할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 철에 의해 그 합성이 증진되는 것으로도 알려져 있다.^{2,3)} Ferritin은 철 뿐만아니라 구리, 납, 카드뮴, 아연, 베릴륨, 알루미늄 등 과도 결합할 수 있어^{3,4)} 오염된 지역에 ferritin을 많이 보유하고 있는 식물체를 심으면 중금속 오염 제거 목적도 달성할 수 있는 것으로 기대되고 있다. 최근 공업지대에서 흘러 나오는 폐수 및 배출가스, 그리고 자동차의 배기가스는 우리가 살고있는 환경의 주요 오염원이 되고 있음은 주지의 사실이다. 더우기 뒤늦게 경제 건설에 최우선 정책을 펴고 있는 중국에 인접해 있는 우리나라는 중국 동 북부와 연안 공업지대에서 분출되는 납, 카드뮴 등 중금속 공해물질이 황사를 통해 혹은 비바람에 실려 산성비와 함께 쉽게 전달될 수 있는 입지적 조건에 있어 환경 전반에 대한 우려의 목소리가 높아지고 있는 실정이다. 이와같은 시점에서 환경오염 요인의 주된 요인중 하나인 중금속의 피해를 경감시킬 수 있는 노력을 우리의 생사 문제라는 인식에서 경주하지 않으면 안된다.

본 연구에서는 향후 콩 ferritin 항체 및 유전자 확보를 목표로 먼저 콩으로부터 ferritin을 각종 크로마토그래피법으로 분리 정제하여 전기영동법, 원자흡광분광도법과 면역확산법에 의해 그 특성을 조사 하였다.

재료 및 방법

재료

콩(*Glycine max*)은 재래시장에서 구입하였고, DEAE-cellulose, Sephacryl S-300, N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[ethanesulfonic acid](Hepes), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), streptomycin sulfate, 원자흡광분석용 철 표준용액 등 사용한 시약의 대부분은 Sigma사(St. Louis, USA)의 품을 사용하였다.

콩 ferritin의 정제

콩으로 부터 ferritin을 분리정제 하기위한 방법은 Sczek과 Joshi의 방법⁵⁾과 호박씨 ferritins 분리시 사용했던 Oh의 방법⁶⁾을 조합 및 변형해서 사용하였다. 약 1 kg의 콩 적당량의 수분존재하에서 72시간동안 발아시켜 수확한 콩을 -70°C 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 시료 PMSF가 0.1 mg/ml 함유된 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)과 믹서를 이용하여 마쇄한 후 여과하고 원분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 streptomycin sulfate가하여 0.3%로 포화시킨 후 원심분리하여 DNA 등의 침물을 제거하였다. 상등액에 ammonium sulfate를 55 % 포용액이 되게한 다음 원심분리하여 침전물을 얻어 PMSF 함유된 상기의 완충액으로 침전물을 녹였다. 이어 동일 완충액을 이용하여 24시간 동안 완충액을 8시간 마다 갈아면서 투석한후 DEAE-cellulose 칼럼(5×40 cm)에 주입한다. 동일 완충액으로 칼럼을 충분히 씻어 결합되지 않은 단백질은 제거하고 난 후 NaCl 농도를 증가시키면서 DEAE

찾는말 : 콩, Ferritin, 철, 정제, 발아
*연락처자

llulose 수지에 결합되어 있는 단백질을 용출시켰다. 용출되어 나오는 단백질을 280 nm에서 흡광도를 측정하고, 색은 405 nm에서의 흡광도 측정으로, 그리고 원자흡광분광도계(Fe hollow cathode lamp, 248.3 nm)로 철의 함유율을 측정하여 콩 ferritin이 함유된 부분을 모았다. 모아진 액중의 단백질은 다시 ammonium sulfate를 55% 되게 하여 침전시킨후 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) 평형화된 Sephacryl S-300 칼럼(2.5×90 cm)에 주입하여 거르기 크로마토그래피를 실시하였다. 용출되어 나온 단백질중 철을 가장 많이 함유하고 있는 부분을 모아 농축하였다. 다시 Bio-Scale Q2 anion exchange column(Bio-Rad, 7×2 mm)과 HPLC(Buffer A: 20 mM sodium phosphate, pH 4; Buffer B: 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.5 M aCl; Flow rate: 1.0 ml/min; Detection: UV at 280 nm)를 용하여 더욱 정제하여 최종적으로 콩 ferritin을 얻었다.

Iron staining

정제된 콩 ferritin중의 철 결합 여부를 확인 하기 위해 uo와 Fridovich법⁹⁾에 준하여 iron staining을 실시하였다. 저 단백질은 3~15%의 linear gradient polyacrylamide 겔에서 전기 영동을 실시하였고 0.05 M 초산 나트륨 완충액(pH 5.0)에 겔을 담근 후 과산화 수소와 diaminobenzoic acid를 각각 40 mM과 80 mM되게 가하여 35°C에서 30분 반응 시켰다. 이어 겔을 증류수로 2회 씻은 후 7% 초산에 담가 두었다.

Immunodiffusion 검색

Immunodiffusion 침전은 Crowle의 방법¹⁰⁾으로 실시하였다. 10 μl의 부피가 들어갈 수 있는 well이 만들어져 있는 % agarose plate를 준비하고 각 well에 시료와 항체를 각각 투입하여 4°C 조건에서 3일간 방치한 후 면역침전된 단백질들을 Coomassie Blue로 염색하였다. Soybean-ferritin으로 끼에서 만든 폴리크로날 항체는 테네시주립대 생화학과의 J. Joshi로부터 기부받은 것을 사용하였다.

Ferritin의 특성분석

철은 원자흡광 분광도계와 원자흡광 철 표준액(Sigma) 사용하여 측정하였으며, 단백질 농도는 gamma globulin 표준단백질로 사용하여 Bradford 법¹¹⁾으로 측정하였다. native molecular weight는 Sephacryl S-300을 이용한 겔거기 크로마토그래피와 gradient gel 전기영동(3~15%)을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

여러 곡물중 콩과 호박씨에는 철이 가장 많은 양 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다.¹⁾ 철을 많이 함유하고 있는 자에는 철 결합 단백질인 ferritin의 양 또한 많을 것으로 각되어 최근 호박씨로부터의 ferritin 정제 및 특성에 대하여 보고한 바 있다.⁸⁾ 본 연구에서는 발아된 콩으로부터

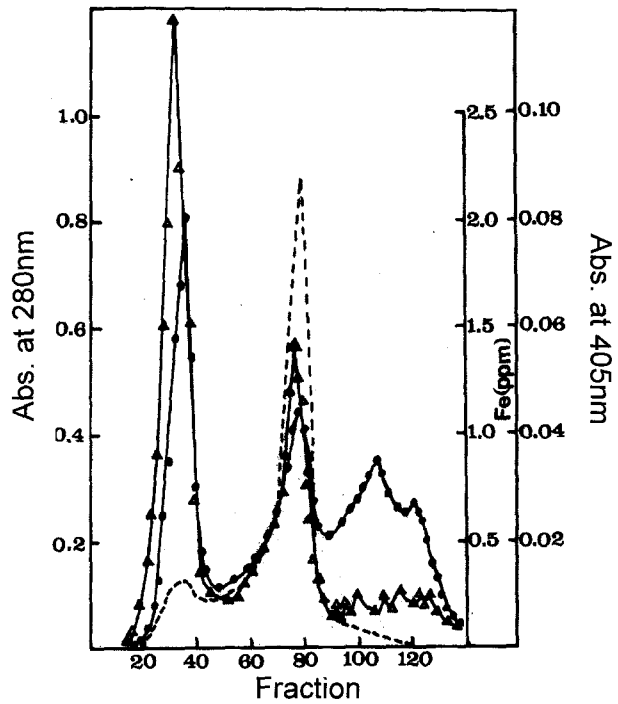


Fig. 1. Gel filtration chromatography on Sephacryl S-300. The pooled fractions from DEAE-cellulose column were concentrated by ultrafiltration in an Amicon stirred cell with a PM-10 membrane and applied to a column of Sephacryl S-300 (2.5×90 cm). Fractions of 2.0 ml were collected at a flow rate of 2.0 ml/15 min. The eluent was monitored for protein and color by measuring absorbance at 280 nm (●) and 405 nm (△), respectively. The content of iron was measured by atomic absorption spectroscopy (···).

ferritin을 ammonium sulfate 침전(0.55 saturation), DEAE-cellulose, Sephacryl S-300, Bio-Scale Q2 column chromatographies를 통하여 분리하였다. 분리과정 중 철 결합-ferritin 단백질의 존재 여부는 280 nm와 405 nm에서의 흡광도 측정 및 원자흡광분광도계를 이용한 시료 단백질 중의 철(Fe) 함유정도에 따라서 판정하였다(Fig. 1). 철을 다량함유하고 있으며, 280 nm와 405 nm에서의 흡광도도 높은 fractions (#65-85)을 콩 ferritin으로 간주하고 정제를 실시하였다. 정제된 단백질은 확보된 soybean-ferritin 폴리크로날 항체와 면역확산법에 의하여 콩 ferritin으로 최종 확인하였다(Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이 정제된 콩 ferritin은 anti-soybean ferritin antiserum과 정상적인 상호 반응성을 보였다. 그러나 horse spleen ferritin은 이 항체와 반응성을 보이지 않아 식물 ferritin과 동물 ferritin 사이에는 항원 인식에 필요한 공통의 결정요소가 없는 것으로 판단된다. 정제된 콩 ferritin 중의 철 함유정도를 확인해 보기 위해 원자흡광분광도계와 철 표준 용액을 사용하여 철 함량을 측정된 결과 콩 ferritin의 철 함량은 833 mol Fe/mol protein으로 얻어졌다(Table 1). 이는 콩 ferritin이 호박씨로부터 분리한 ferritin에 비해서 월등히 많은 양의 철을 함유하고 있는 것이다. 또한 콩 ferritin은 염색법에 의한 확인에서도 horse spleen ferritin에 상응하는 철을 함유하고 있는 것으로 나타났으며 pumpkin ferritin에서는 거의 확인할 수 없었다(Fig. 3).

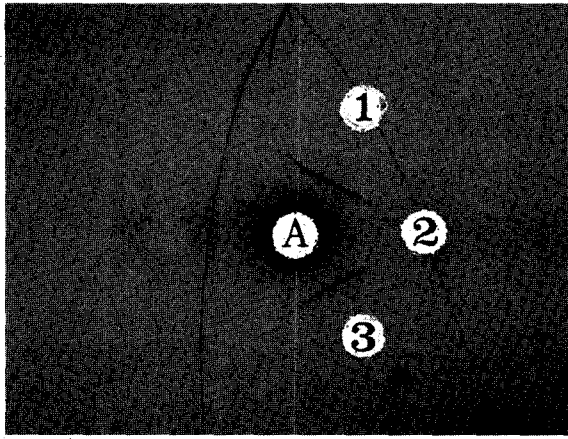


Fig. 2. Immunoprecipitation of soybean ferritin with anti-soybean ferritin antiserum. (A) rabbit anti-soybean antiserum, 4 μ g; ①, ③ soybean ferritin 15 μ g, 7.5 μ g, each); ② horse spleen ferritin, 10 μ g. Samples were placed in 10 μ l wells cut in a 1% agarose plate (1 mm thick), allowed to diffuse for 3 days in a cold room, washed in dilute phosphate buffer (pH 7.3), and stained in Coomassie Blue R-250.

Table 1. Concentration of iron in purified soybean ferritin.*

	Fe g/ μ g protein ^b	mol Fe/mol protein ^c
soybean FR	831.0×10^{-10}	833
pumpkin FR	41.6×10^{-10}	27

*Soybean ferritin was isolated from germinated soybean seeds grown for 72 hr by using the procedures described in Materials and Methods.

^bIron was quantitated by atomic absorption spectrophotometer by using iron atomic absorption standard solution. The concentration of protein was determined by the method of Bradford¹¹⁾ by using the Bio-Rad reagent and gamma globulin as a standard protein.

^cRatio was calculated by using 560,000 for soybean ferritin and 360,000 for pumpkin ferritin⁸⁾ as molecular weights. FR, ferritin.

Sephacryl S-300 겔여리기 크로마토그래피(Fig. 4)와 gradient 겔 전기영동(Fig. 3)을 통해 정제된 콩 ferritin의 native molecular mass의 크기는 510~560 kDa로 조사되었으며, SDS-PAGE 상에서 21 kDa 크기의 단일 밴드를 보였다(Fig. 5). 콩 ferritins은 Sczekan과 Joshi⁷⁾에 의해서 soybean seeds 로 부터, Ko 등¹²⁾에 의해서는 soybean nodule로 부터 분리 된 바 있는데, 본 연구에서 결정된 콩 ferritin의 분자량은 Sczekan과 Joshi에 의해 보고된 22 kDa과 매우 유사한 크기 이다. 그러나 분자량 21~22 kDa인 콩 ferritins 크기는 French-bean seed ferritin의 26.5 kDa¹³⁾나 maize, pea, alfalfa seed ferritins의 크기 26.5~28 kDa¹⁴⁻¹⁶⁾에 비해서는 작은 것이다. 이는 단백질 가수 분해 효소에 의해 분해되었을 가능성과 한 조직내 크기가 다른 ferritins이 존재할 가능성 등으로 해석될 수 있겠다. Sczekan과 Joshi는 28 kDa 크기의 ferritin 단백질을 subtilisin으로 처리 했을 경우 22 kDa 크기의 단백질을 쉽게 얻을 수 있다고 하였다.⁷⁾ 이는 비록 PMSF와 같은 효소 저해제를 정제과정 중에 사용했을 지라도 어떤 특정 가수분해 효소에 의해 콩 ferritin이 분해되었을 가능성을 시사하고 있는 경우이다. 또한 콩을 발아 시키기 위해 물에 담그면 3~6시간 동안은 매우 많은 양의 철이 용출되어 나오고 발아가 시작되는 시간 부터는 철의 재 흡수가 활발해

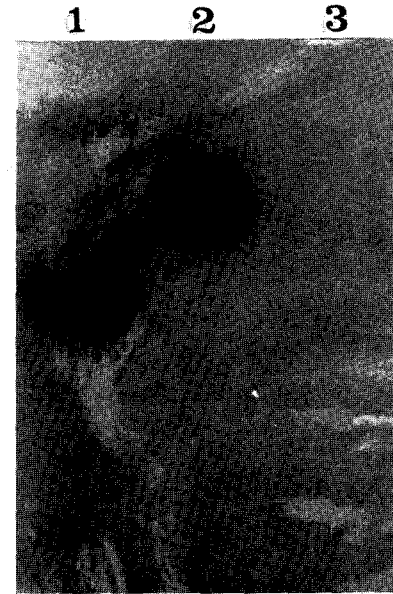


Fig. 3. Iron staining of soybean ferritin and standard horse spleen ferritin. Ferritin (15 μ g) was applied on 3~15% linear polyacrylamide gel and electrophoresis was conducted at constant voltage (100V), for 22 hr. The gel was stained for iron as described in Materials and Methods. Lane 1, horse spleen ferritin (Mr ~450,000, ref. 7); lane 2, soybean ferritin (Mr ~560,000, this study); lane 3, pumpkin ferritin (Mr ~360,000, ref. 8).

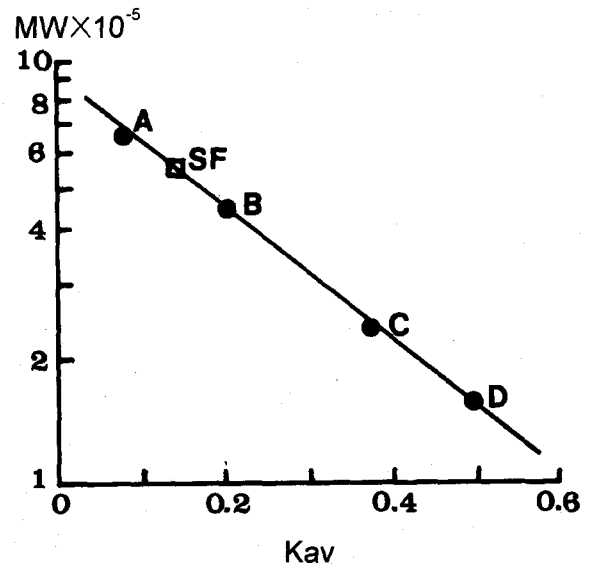


Fig. 4. Molecular weight determination of soybean ferritin by Sephacryl S-300 gel filtration. Purified soybean ferritin was applied to Sephacryl S-300 column (2.5 \times 85 cm) which had been precalibrated with marker proteins. The marker proteins were as follows. A: Thyroglobulin (669,000), B: Horse spleen ferritin (450,000), C: Catalase (232,000), D: Aldolase(158,000). MW molecular weight; SF, soybean ferritin. $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$.

지는 것⁷⁾을 보면 seed embryo의 형성과 발아시 매우 활발한 철의 움직임과 재분배가 일어나는 것을 알 수 있다. 이와 같은 요인들로 인해 발아시 크기가 다른 ferritins이 합성될 수 있다고 사료된다. 실제로 식물의 성장과 발달 과정에 따라 크기가 다른 ferritins이 발견되기도 했으며,^{8,14)} 식물의 조

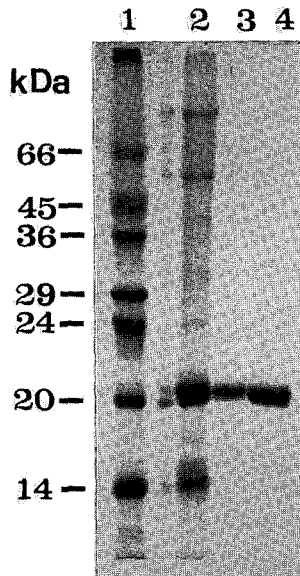


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified soybean ferritin. Ferritin was analyzed by SDS-PAGE on 12.5% (w/v) polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, 20 μ g of protein mixture before Bio-Scale Q2 chromatography; lane 3, 5.0 μ g of ferritin from Bio-Scale Q2 chromatography; lane 4, 10 μ g of ferritin from Bio-Scale Q2 chromatography. Molecular weight marker proteins were bovine albumin (66,000), egg albumin (45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000), carbonic anhydrase (29,000), trypsinogen (24,000), soybean trypsin inhibitor (20,000), and α -lactalbumin (14,000).

내에 여러개의 ferritin genes이 존재한다는 것이 보고되었다.^{17,18)} 따라서 콩 조직내에는 21 kDa 크기의 ferritin 외에 또 다른 크기의 ferritin이 존재할 가능성이 있는 것으로 추측되며, 콩 ferritin 항체 및 유전자의 확보와 성장과 발달 단계에 따른 ferritin의 발현 연구 등을 통한 콩 ferritins에 대한 앞으로의 연구는 이에 대한 답을 줄 수 있을 것이다. 한편, 본 연구에서 콩 ferritin의 native molecular mass가 510~560 kDa으로 측정되었는데, 이는 약 24~27개의 소단위가 결합되어 있는 것에 상당하는 것이다. 다른 식물로부터 정제된 ferritins의 apparent molecular mass의 경우를 살펴보면 pea seed의 540 kDa,¹⁴⁾ alfalfa seed의 560 kDa,¹⁶⁾ 콩 nodule의 570 kDa¹²⁾ 등이 있다. 또한 발아된 호박씨로부터는 575 kDa과 360 kDa의 ferritins이,⁹⁾ 그리고 콩으로 부터도 572-kDa과 460 kDa의 ferritins이 검출된바⁷⁾ 있다. 이와같은 사실로부터 식물의 경우 ferritin 소단위가 assembling 되어 하나의 성숙한 phytoferritin이 만들어 질 때 다양한 수의 소단위로 구성될 수도 있음을 시사하는 것으로 앞으로 이에 대한 좀더 체계적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Adams, C. F. (1975) In Nutritive Value of American Foods, pp. 4-174, U.S. Department of Agriculture Handbook 456.
- Munro, H. N. and M. C. Linder (1978) Ferritin: Structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol. Rev.* **58**(2), 318-396.
- Fleming, J. and J. G. Joshi (1987) Ferritin: Isolation of aluminum-ferritin complex from brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7866-7870.
- Joshi, J. G. (1990) Minireview: Aluminum, a neurotoxin which affects diverse metabolic reactions. *BioFactors* **2**, 163-169.
- Price, D. J. and J. G. Joshi (1982) Ferritin: A zinc detoxicant and a zinc ion donor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3116-3119.
- Price, D. J. and J. G. Joshi (1983) Ferritin: Binding of beryllium and other divalent metal ions. *J. Biol. Chem.* **258**, 10873-10880.
- Sczekan, S. R., and J. G. Joshi (1987) Isolation and characterization of ferritin from soybeans(*Glycine max*). *J. Biol. Chem.* **262**, 13780-13788.
- Oh, S.-H., S.-W. Cho, T.-H. Kwon, and M.-S. Yang (1996) Purification and characterization of phytoferritin. *J. Biochem. Mol. Biol.* **29**(6), 540-544.
- Kuo, C.-F. and I. Fridovich (1988) A stain for iron-containing proteins sensitive to nanogram levels of iron. *Anal. Biochem.* **170**, 183-185.
- Crowle, A. (1973) Immunodiffusion, Academic Press, New York.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Ko, M. P., P. Y. Huang, J. S. Huang and K. R. Barker (1987) The occurrence of phytoferritin and its relationship to effectiveness of soybean nodules. *Plant Physiol.* **83**, 299-305.
- Van Der Mark, F., W. Van Den Briel, and H. G. Huisman (1983) Phytoferritin is synthesized *in vitro* as a high-molecular-weight precursor: Studies on the synthesis and the uptake *in vitro* of the precursors of ferritin and ferridoxin by intact chloroplasts. *Biochem. J.* **214**, 943-950.
- Laulhere, J. P., A. M. Lescure, and J. F. Briat (1988) Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soybean seeds: Distribution in various pea organs. *J. Biol. Chem.* **263**, 10289-10294.
- Ragland, M., J. F. Briat, J. Gagnon, J. P. Laulhere, O. Massenet, and E.C. Theil (1990) Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *J. Biol. Chem.* **265**, 18339-18344.
- Barcelo, F., F. Miralles and C. O. Arean (1997) Purification and characterization of ferritin from alfalfa seeds. *J. Inorg. Biochem.* **66**, 23-27.
- Fobis-Loisy I., K. Loidon, S. Lobreaux, M. Lebrun, and J. Briat (1995) Structure and differential expression of two maize ferritin genes in response to iron and abscisic acid. *Eur. J. Biochem.* **231**, 609-619.

18. Wicks, R. E. and B. Entsh (1993) Functional genes found for three different plant ferritin subunits in the legume, *Vigna unguiculata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 813-819.

Investigation of useful components in soybean seeds: Purification and characterization of soybean ferritin

Suk-Heung Oh* and Kyung-Won Seo¹(*Department of Biotechnology, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea, and ¹Department of Life Science and Technology, Graduate School, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea*)

Abstract : Ferritin from germinated soybean seeds was purified by ammonium sulfate precipitation (0.55 saturation), ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, gel filtration chromatography on Sephacryl S-300, and HPLC with Bio-Scale Q2 column. SDS-PAGE analysis showed that the purified ferritin is composed of subunit with an apparent M_r 21,000. The molecular mass of the native soybean ferritin estimated by gel filtration on Sephacryl S-300 and non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis appeared to be 510~560 kDa. Soybean ferritin contained 833 mol Fe/mol protein, which is 31-fold more iron than pumpkin ferritin and stained positive for iron on non-denaturing gel. Soybean ferritin cross-reacted with anti-soybean rabbit ferritin antiserum.

Key words : soybean, ferritin, iron, purification, germination

*Corresponding author