

콩 β -Conglycinin의 대장균 발현과 정제

오 문 헌 · 노 영 희*

충청대학 식품공업과, *충북대학교 식품공학과

Expression and Purification of Soybean β -Conglycinin from *Escherichia coli*

Moon-Hun Oh and Young-Hee Noh*

Dept. of Food Technology, Chung-Cheong College, Chung-Buk 363-890, Korea

*Dept. of Food Engineering, Chung-Buk National University, Cheong-Ju 361-763, Korea

Abstract

Soybean protein consists of two major components β -conglycinin and glycinin, which together constitute 70 % of the total seed storage protein at maturity. β -Conglycinin is a trimeric glycoprotein and formed by the assembly of various combinations of three subunits, α , α' and β , which have molecular weights of 69,000, 72,000 and 42,000, respectively. Recently, β -conglycinin was identified as powerful LDL lipoprotein receptor activation, hypercholesterolemia and major allergenic proteins. To investigate these reasons, we constructed an expression system of cDNA encoding α -subunit of β -conglycinin in *Escherichia coli* and purified the expressed protein. The pro- β -conglycinin synthesized in *Escherichia coli* BL 21(DE3) comprised approximately 15 % of the total bacterial proteins and the expressed protein are formed soluble and trimer such as native protein in *Escherichia 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 Butyltoyopearl.

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

서 론

콩에는 40~45 %나 되는 많은 단백질이 함유되어 있고, 다른 식물성 단백질보다 영양성, 기능성 및 경제성이 뛰어나다. 콩으로 만든 가공식품을 장기간 섭취하면 각종 성인병에 걸리지 않는다는 결과가 보고되었고,^{1,4)} 콜레스테롤 저하작용이 있는 것으로 알려졌다.⁵⁾ 그러나 동물성단백질에 비하면 영양 및 가공적성이 뒤떨어진다.⁶⁾ 그래서 영양성 및 가공적성을 개선해야 한다. 따라서 식물성 식품단백질의 품질을 향상시키려는 설계를 많이 시도하고 있다. Utsumi 등^{7~10)}과 김 등^{11~12)}은 단백질공학적인 방법으로 균체로부터 영양성 및 가공적성이 우수한 콩단백질을 얻은 바 있다.

콩단백질은 7S globulin(β -conglycinin)과 11S globulin(glycinin)을 주성분으로 하고 있다. 그 중 성분의 대부분을 차지하는 glycinin이 단백질공학의 주요 연구 대상이 되어 왔다.¹³⁾ 그러나 Ogawa 등^{14,15)}은 콩단백질의 알레르기원이 β -conglycinin으로 밝혔고, Lovati 등¹⁶⁾은 콜레스테롤 저하와 β -conglycinin과 관계가 있음을 밝혀 분자레벨에서의 β -conglycinin의 연구가 필요하게 되었다. 그러나 종자의 저장단백질은 서브유닛 조성이 다른 분자종이 존재하기 때문에 균일 분자종을 얻기가 어려워서 해석이 어려웠다. β -conglycinin도 당단백질로 분자량 57kDa~72kDa의 α' , 분자량 57kDa~68kDa의 α , 분자량 42kDa~52kDa인 β 의 3종 서브유닛으로 구성된 trimer이다. 또한 그 조성의 차이에 의해 7종 (β_3 , $\alpha'\beta_2$, $\alpha\beta_2$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha_2\beta$, $\alpha_2\alpha'$, α_3)의 분자종이 있

Corresponding author : Moon-Hun Oh

다. 따라서 콩단백질 β -conglycinin의 분자레벨에서의 기능적 특성을 규명하기 위해서는 한정된 분자중 조성을 가진 단백질이 필요하기 때문에 β -conglycinin의 유전자 / cDNA의 대장균 발현계를 구축하여 균일분자중 단백질 표품을 조제해야 한다. 그래서 본 연구자는 전보¹⁷⁾에서 β -conglycinin의 β -subunit를 대상으로 대장균 발현계를 구축하여 발현단백질을 얻었다. 본 연구는 β -conglycinin의 α -subunit를 대상으로 대장균 발현계를 확립하고 정제를 한 결과이다.

재료 및 방법

1. 재 료

제한효소 Nco I, Bam HI 등은 Takara Shozu, pBluescript phagemid는 Stratagene, 발현벡터 pET 21d와 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 sulfonylfluoride(PMSF)는 Sigma, Bacto tryptone과 Bacto yeast extract는 Difco, Q-Sepharose는 Pharmacia, TSK gel Butyltoyoppearl 650M은 Tosoh제품을 사용하였다. 기타 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다. 콩종자는 일본 Shiroturunoko품종이 사용되었다.

2. 유전자 분리, 증폭 및 발현 plasmid의 구축

1) β -conglycinin의 α -subunit cDNA의 분리

Katsube 등¹⁸⁾이 구축한 Lambda ZAP 콩 cDNA library로부터 약 80,000 plaque를 스크리닝하였다. 사용한 probe는 5'-ATGATGAGAGCGCGTT-CCCATTACTGTTG-3' oligonucleotide이며 T4 polynucleotide kinase를 사용하여 [γ -³²P] dATP로 말단을 표지하였다. 1차 스크리닝하여 probe로부터 100여개의 양성 클론을 얻고 2차 스크리닝하여 12개의 클론을 분리하였다. 다음 Stratagene사의 매뉴얼에 따라 pBluescript phagemid에 변환시켰다. 그리고 Eco RI과 Xho I으로 절단해서 insert단편을 확인하고 Sac I으로 처리하여 선별을 행하였다. DNA sequence는 Applied Biosystems sequencer model 310(Perkin Elmer)과 ABI dye terminator cycle sequencing kit(Applied Biosystems)의 Ampli Taq polymerase FS를 이용, Sanger 등¹⁹⁾의 dideoxy chain-termination 방법으

로 결정하였다.

2) β -conglycinin의 α -subunit 유전자 증폭

pBluescript를 template로서 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)로 증폭시켰다. 즉 primer는 5'-GTGGAGAAAGAAGAATGTG-3'의 N-말단아미노산측과 Bam HI제한부위를 갖는 5'-C-GCGGATCCATACTTATTCAGTAAAAAGC-C-3'의 C-말단아미노산측으로 구성하고 94°C 30초, 55°C 2분, 72°C 2분의 30cycle과 72°C 7분의 1 cycle로 반응시켰다.

3) β -conglycinin의 α -subunit 유전자의 발현 plasmid 구축

Insert 단편을 함유한 PCR 에탄올침전 반응산물은 Blunting kit(Takara Co.)로 blunt하고 Bam HI으로 처리하였다. DNA fragment는 pET-21 d vector(Novagen Co.)의 Nco I과 Klenow처리, Bam HI부위에 삽입하여 발현 plasmid를 구축하였다.

발현 plasmid는 *Escherichia coli* BL21(DE 3)에 형질전환시켰다.

3. 유전자 대량발현

2 L용 삼각플라스크에 Luria-Bertani 배지(LB 배지, pH 7.5, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, carbenicillin 25 μ g/ml) 600ml를 넣었다. 다음 동일 배지에서 하루밤 배양한 전배양액 6ml를 넣고 37°C에서 160stoke/min. 속도로 진탕배양하였다. 배양중 600nm의 흡광도가 0.6일 때 IPTG 유도제를 최종농도가 1mM 되도록 첨가하였다. 유도 후 20°C에서 24시간 진탕배양시켜 콩단백질 β -conglycinin α -subunit를 발현시켰다.

4. 발현단백질의 분석

발현단백질 β -conglycinin α -subunit를 분석하기 위하여 대장균 균체 회수는 4°C, 20분, 10,000 \times g로 원심분리(원심분리기; MR15A, Tomy Seiko Co.)하여 얻었다. 침전물은 SDS-sample 완충액(62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 0.2 M 2-mercaptoethanol)으로 가열, 용해시키고 Laemmli의 방법²⁰⁾에 따라 11%(mass/vol.) SDS polyacrylamide gel 전기영동으로 분석하였다. 단백질은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색시켰다. Scanning은 densitometer(Shimadzu

dualwavelength TLC scanner CS-910, Shimadzu Co. Ltd.)를 사용하였다.

단백질함량은 Bradford의 방법²⁰⁾으로 측정하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다. 발현단백질의 N-말단아미노산배열 분석은 Protein Sequencer Procise 490 (Applied Biosystems)로 행하였다. Phenylthiohydantoin amino acid 유도체는 역상HPLC로 확인하였다.

5. 발현단백질의 정제

발현시킨 단백질 β-conglycinin의 α-subunit는 Fig. 1과 같이 정제하였다. 즉 발현시킨 대장균(wet weight, 4℃, 20min, 10,000×g 원심분리하여 회수하고 -80℃에 저장) 균체 40gram을 35mM sodium phosphate buffer(pH 8.0, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM 2-ME, 0.1M NaCl 함유) 240ml에 현탁시키고 4℃에서 200W로 초음파(In-

sonator 201M, Kubota Co. Ltd.) 파쇄시켰다. 다음 원심분리(Hitachi HIMAC centrifuge SCR 20B)하여 상정액을 얻었다. 상정액은 20~40%의 황산암모늄으로 분별침전시켰다. 황산암모늄 침전물은 상기 완충액으로 0.1M NaCl부터 0.4M의 NaCl 농도기울기로 Q-Sepharose 컬럼으로 HPLC(Shimadzu LC 10Ai)하였다. 다음 β-conglycinin의 α-subunit 주분획을 모아 상기 완충액중에서 Butyltoypearl의 소수성 컬럼크로마토그래피하여 25% 황산암모늄으로부터 0% 황산암모늄까지 농도기울기로 행하였다.

결과 및 고찰

1. 유전자 클로닝 및 발현계 구축

콩 자엽 cDNA library로부터 클로닝하였다. 사용한 프로브는 합성 올리고뉴클레오티드를 γ-³²P ATP로 말단을 표지하였다. 1차 스크린시 8만개중 100개의 양성클론을 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 α-서브유닛영역에 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 I분해로 pET 21d와 5'측의 junction을 확인한 후 E. coli BL21(DE3)에 형질전환시켰다.(Fig. 2)

한편, 콩 종자 cDNA library로부터 β-conglycinin의 α-subunit에 대하여 가장 긴 클론이 2039 nucleotides였다. 이것은 전에 Sebastiani 등²²⁾이 보고한 것과 일부 몇 개의 nuclotide sequence상 차이가 있으나 대부분 일치하였다. 다만 일부 차이가 있는 것은 일부 mutation으로 보아야 할 것이다. Wright 등²³⁾은 Fig. 3과 같이 β-conglycinin의 α, α'-subunit의 보존영역과 가변영역을 보고한 바 있다. 또한 α, α'과 β-subunit는 서로 유사한 1차 구조를 가지며 특히 α와 α'은 유사성이 높다. 즉 α, α'은 β-su-

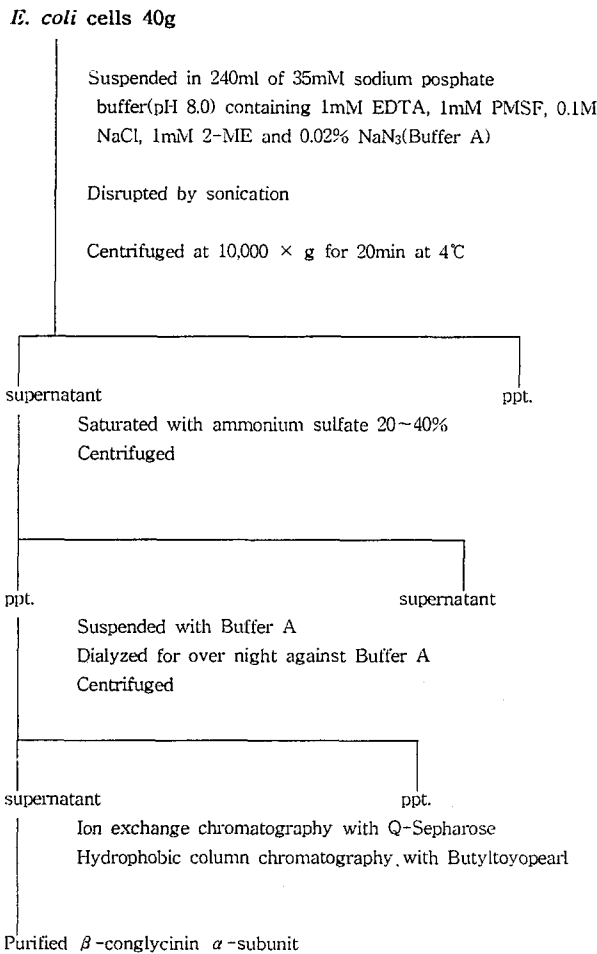


Fig. 1. Purification procedure of β-conglycinin α-subunit from E. coli.

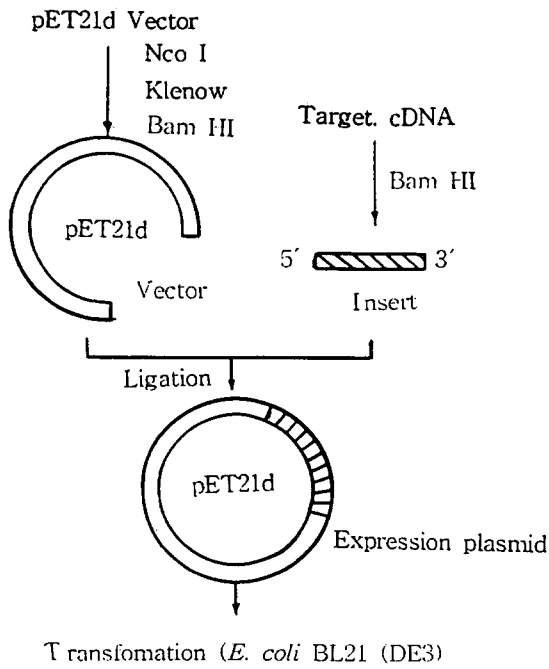


Fig. 2. Scheme for construction of expression plasmid for β -conglycinin α -subunit.

bunit와는 달리 extension region을 가진다. 결국 α 와 α' subunit의 유사성은 높으나 α -subunit만이 높은 알레르겐성을 나타낸다고 보고하였다.^{14,15)} 따라서 α -subunit의 epitope부의 구조와 그것에 대응하는 α' -subunit의 구조를 비교하는 것에 의하여 밝혀질지 모른다. 그래서 저자들은 추후 β -conglycinin의 α' -subunit 대장균 발현계의 확립과 결정화를 시도할 예정이다. β -conglycinin의 결정화는 β -subunit만

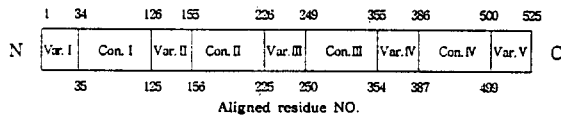


Fig. 3. Variable and conserved region in α and α' subunit of β -conglycinin Conserved I 35-125 Homology region A(76~120) : residues 36~65 homologous, with residues 290~319 : residues 74~111 homologous with residues 317~354. Variable II 126~155 Tandem repeat in β -conglycinin α , Conserved II 156~225 Homology region B (198-223). Conserved III 250~354 Homology region C (306-354) : residues 290~319 homologous with residues 36-65 : residues 317~354 homologous with residues 74~111. Conserved IV 387~499 Homology region D (391~421)

이 성공한 보고가 있지만 X-선 해석에 이용될 만한 것은 아니었다. (森田紳平, 不二製油(株)中央研究所, 日本) 이 원인도 다형성에 있으므로 β -conglycinin의 결정화를 위해서도 대장균 대량 발현계의 확립이 필요하다.

2. 단백질 발현 및 발현단백질의 특성

발현 플라스미드를 구축하고 구축된 플라스미드를 대장균에 형질전환시켜 IPTG 유도제를 이용 단백질을 발현시켰다. 대장균의 콩단백질 발현 최적 배양조건을 검토하기 위하여 IPTG유도 후 20℃와 37℃에서 24시간 배양하여 발현단백질을 조사한 바 Fig. 4의 1과 같이 β -콩글리시닌의 α -서브유니트가 균체 총단백질의 15%까지 발현되었다. 또한 배양시간에 따른 발현단백질은 Fig. 4의 2와 같이 48시간 배양했을 때와 차이가 별로 없었다.

일반적으로 대장균에서 발현된 단백질이 고효율로 과잉 발현된 경우 이중 유전자 산물은 균체내에 과립상의 inclusion body를 형성한다. 즉 진핵생물 유래의 외래유전자를 대장균에서 높게 발현시키면 주종의

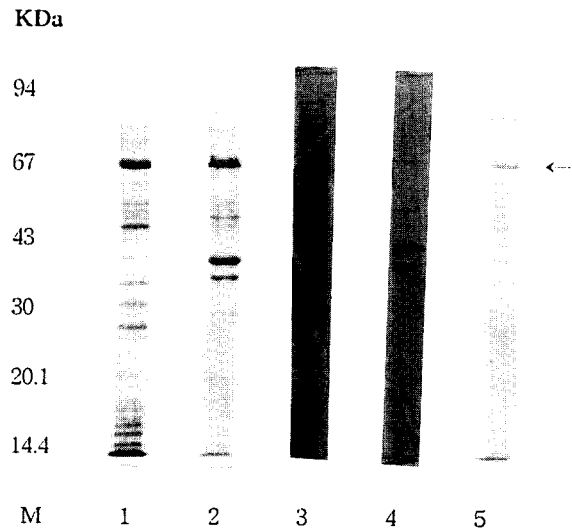


Fig. 4. High level expression of β -conglycinin α -subunit in *E. coli*. A 11% SDS-polyacrylamide gel is shown displaying the total proteins of *E. coli* strain BL21(DE3) : Lane M; The total weight markers. Lane 1,2; The total proteins of *E. coli* expression for 24hrs and 48hrs, respectively. Lane 3; The soluble proteins of *E. coli*. Lane 4,5; The insoluble proteins of *E. coli*. The arrow indicates the position of β -conglycinin α -subunit. The numbers on the left denote molecular weights of the markers.

단백질이 균체내에 응집하고 생리적으로 불활성인 봉입체를 형성한다. 이 봉입체 형성은 생성된 단백질이 균체내의 단백질 가수분해의 작용을 받지 않기 위함이다. 따라서 본 발현단백질의 가용성 여부를 조사한 바 Fig. 4의 3, 4와 같이 90% 이상 가용화되었다. 즉 발현시킨 대장균을 회수하여 파쇄하고 원심분리 후 SDS-PAGE로 분석한 바 β -콘글리시닌의 α -서브유니트는 상정액에 90% 이상 존재하였다. 또한 온도에 따른 발현량의 변화는 Fig. 4의 3과 같이 예민하지 않았지만 용해성은 Fig. 4의 5와 같이 민감하였다. 즉 저온에서 발현시킨 경우 용해성이 높았다.

3. 발현단백질의 정제 및 특성

재조합 β -conglycinin의 α -subunit 가용성 확보를 정제하였다. 발현된 단백질은 Fig. 1과 같이 정제하여 Fig. 5의 결과를 얻었다. 즉 먼저 발현시킨 대장균을 원심분리하여 -80°C 에 보관한 균체 40g을 초음파로 파쇄하고 원심분리하여 상정액을 얻었다. 다음 상정액을 20~40% 황산암모늄으로 분별(Fig. 5의 2) 침전시키고 35mM sodium phosphate 완충액(pH 8.0)으로 0.1M에서 0.4M까지 NaCl의 농도 기울기로 Q-Sepharose 이온교환 크로마토그래피하였다.(Fig. 5의 3) 다음 Butyltoyopearl로 소수성 컬럼 크로마토그래피한 결과 SDS-PAGE상 균일한 것으로 확인되었다(Fig. 6). 즉 정제 후 재조합 β -conglycinin의 α -subunit는 Fig. 5의 4와 같이 SDS/PAGE상 순수하게 정제되었다. 또한 단백질

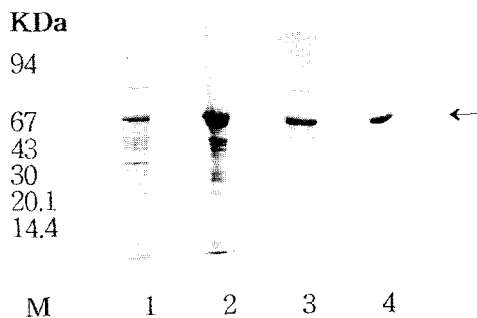


Fig. 5. SDS-PAGE of β -conglycinin α -subunit at difference stages of purification. Lane M, molecular weight of markers : Lane 1, crude extract of induced E. coli cells : Lane 2, fraction with 20~40% saturation of ammonium sulfate : Lane 3, Q-Sepharose pool : Lane 4, Butyltoyopearl pool. The arrow indicates the position of β -conglycinin α -subunit. The numbers on the left denote molecular weights of markers.

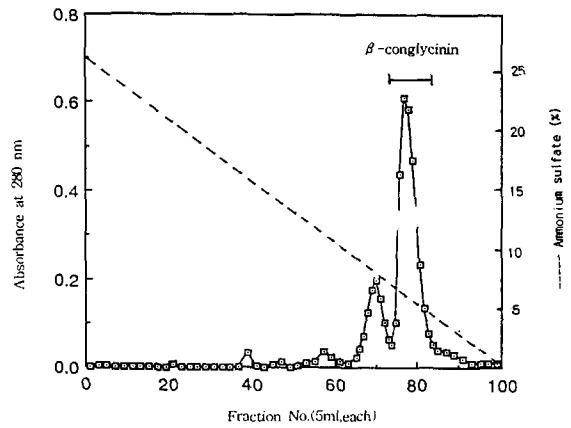


Fig. 6. Purification of β -conglycinin α -subunit by a Butyltoyopearl column chromatography. The protein content of each fraction was measured by spectrophotometer at 280nm. The bar indicates the column fractions that were pooled. The samples of selected fractions were analyzed by SDS-PAGE on 11% gels.

의 N-말단 아미노산 배열을 분석한 바 cDNA로부터 예상된 배열과 일치하였다. 즉 recombinant단백질을 확인하기 위하여 발현정제단백질의 N-말단 아미노산 배열을 분석한 결과 분석된 9개의 아미노산 잔기(V-E-K-E-E-C-E-E-G-)가 예상으로 보고된 배열과 일치하였다. N-말단 methionine잔기는 절단되었다. 전보¹⁷⁾에서 β -conglycinin의 β -subunit는 절단되지 않은 상태로 얻어졌다고 보고한 것과는 다르다. 즉, 대장균을 숙주로 하여 과잉생산된 목적단백질의 N말단에 종종 번역 개시시에 부가된 메티오닌잔기가 제거되지 않고 잔존하기 때문이었다.

한편 대장균에서 발현된 단백질이 콩속에서와 마찬가지로 α -서브유니트가 trimer로 회합하는지 검토하였다. 즉 발현단백질을 파쇄, 추출하여 설탕밀도기울기로 원심분리하여 SDS-PAGE로 분석한 결과 트리머의 크기로 나타났다.²⁰⁾ 따라서 대장균에서 발현한 콩단백질 β -콘글리시닌 α -서브유니트는 천연의 단백질과 마찬가지로 트리머로 형성되어 있는 것으로 확인되었다. 결국 발현된 단백질이 고차구조형성력을 가진 것으로 확인되었다.

요 약

콩 단백질은 글리시닌과 β -콘글리시닌을 주요 성분으로 하며, 콩 β -콘글리시닌이 나타내는 알레르기 원인과 콜레스테롤 저하 작용을 밝히고자 유전자 공

학적인 방법을 시도하였다. 즉 β -콩글리시닌의 α -subunit를 유전자 클로닝하고 대장균에서의 발현시스템을 구축하였다. 발현백터는 pET21d이며 플라스미드를 구축하여 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켰고 발현된 단백질은 균체전체 단백질의 15%이며 90% 이상이 가용화 상태로 축적되었다. 축적된 발현 단백질은 천연의 β -콩글리시닌과 동일한 트리머로 확인되었다. 발현 단백질은 20~40% 황산암모늄 분별침전과 Q-Sepharose 이온교환크로마토그래피, Butyltoyopearl 소수성 컬럼크로마토그래피로 정제하였다.

이것은 콩단백질의 기능특성을 규명하는데 필요한 대장균 대량 발현계를 확립하고 발현 단백질의 정제 방법을 확립한 결과이다.

감사의 말

이 논문은 1997년도 충청대학 교내연구비에 의하여 수행되었다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 권태완, 송영선, 김정상, 문갑순, 김정인, 홍정화: 콩식품의 생리활성에 관한 국내연구동향. *한국콩연구회지*, 15, 147~160 (1998).
2. Saio, K.: Soybean food industry for the 21st century, *Korea Soybean Digest*, 15, 94~105 (1998).
3. Messina, M.: Soyfoods, soybean isoflavones and bone health, *Korea Soybean Digest*, 15, 122~136 (1998).
4. Holt, S.: Soya for health: The definitive medical guide, Mary Ann Liebert Inc, New York, USA (1996).
5. 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).
6. 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.) pp107~179, Academic press. Orlando, Florida, USA (1985).
7. Utsumi, S.: Plant food protein engineering, *Advances in Food and Nutrition Research*, 36, 89~208 (1992).
8. Utsumi, S. and Kito, M.: Improvement of food protein function by chemical, physical and biological modifications, *Agric. Food Chem.*, 2, 261~278 (1991).
9. Utsumi, S., Gidamis, A. B., Kanamori, J., 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).
10. Utsumi, S., Gidamis, A. B., Mikami, B. and Kito, M.: Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the soybean proglycinin expressed in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 233, 177~178 (1993).
11. Kim, C. S., Kanya, 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).
12. Kim, C. S., Lee, S. P., Ko, S. K., and Kang, S. S.: Expression and purification of soybean proglycinins modified by protein engineering, *Foods Biotech.*, 6, 314~318 (1997).
13. Utsumi, S., Gidamis, A. B., Takenaka, Y., Maruyama, N., Adachi, M. and Mikami, B.: Crystallization and X-ray analysis of normal and modified recombinant soybean proglycinins, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 650, 257~270 (1996).
14. Ogawa, T., Tsuji, H., Bando, N., Kitamura, K., Zhu, 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).
15. 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).
16. Lovati, M. R., Manzoni, C., Gianazza, E., and Sirtori, C. R.: Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2474~2480 (1998).
17. 오문현, 정재홍, 노영희, 이희봉: 콩단백질의 대장균 발현과 정제, *한국식품영양학회지*, 9, 404~408 (1996).
18. Katsube, T., Adachi, M., Maruyama, N., Ichise, K., Takenaka, Y. and Utsumi, S.: Nucleotide sequence of a soybean cDNA encoding epoxide hydrolase, *Plant Physiol.*, 109, 722~723 (1995).
19. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463~5467 (1977).
20. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680~685 (1970).
21. 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).
22. 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).
23. Wright, D. J.: The seed globulins, In "Developments in food proteins-5", p. 81~157, Elsevier, London (1987).
24. Oh, M. H., Maruyama, N, Katsube, T., Wada, Y, Okuda, E., Nakagawa, S. and Utsumi, S.: The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean β -conglycinin in folding, assembly and structural features, *Eur. J. Biochem.*, 258, 854~862 (1998).
-

(1998년 5월 12일 접수)