

## 콩 종자에서 쿠니츠트립신인히비터와 P34 단백질의 유전

한은희 · 성미경 · 백운장 · 심상인 · 김민철 · 정종일<sup>†</sup>

경상대학교 농학과, 생명과학연구원

### Inheritance of Kunitz Trypsin Inhibitor and P34 Protein in Soybean Seed

Eun Hui Han\*, Mi Kyung Sung\*, Woon Jang Baek\*, Sang In Shim\*, Min Chul Kim\*, and Jong Il Chung\*<sup>†</sup>

Department of Agronomy, Research Institute of Life Sci., Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**ABSTRACT** Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] protein is a high quality source for food and feed. But, antinutritional factors in the raw mature soybean are exist. Kunitz trypsin inhibitor (KTI) protein is a main antinutritional factor in soybean seed. Also, P34 protein, referred as *Gly m* Bd 30K, has been identified as a predominant immunodominant allergen. Genetic relationship between KTI protein and P34 protein could be useful in soybean breeding program for the genetic elimination or reduction of these factors. The objective of this study was to determine the independent inheritance or linkage between KTI protein and P34 protein in soybean seed. A total of 479 F<sub>2</sub> seeds were obtained from the cross of 07B1 and PI567476 parents. KTI protein and relative amount of P34 protein were analysed from F<sub>2</sub> seeds harvested from the F<sub>1</sub> plants by using SDS-PAGE and Western blot analysis. The segregation ratios of 3 : 1 for KTI protein (353 KTI protein present : 126 KTI protein absent) and relative amount of P34 protein (363 normal amount of P34 protein : 116 low amount of P34 protein). The segregation ratio of 3 : 1 suggested that KTI protein and relative amount of P34 protein in mature soybean seed were controlled by a single major gene. The segregation ratios of 9 : 3 : 3 : 1 (266 KTI protein present, normal amount of P34 protein: 88 KTI protein present, low amount of P34 protein: 102 KTI protein absent, normal amount of P34 protein: 23 KTI protein absent, low amount of P34 protein) and Chi-square value ( $\chi^2=3.31$ , P=0.346) were observed in F<sub>2</sub> seeds. This data showed that KTI protein was inherited independently with relative amount of P34 protein in soybean. These results will be helpful in breeding program for selecting the line with lacking KTI protein and reduced amount of P34 protein in soybean.

**Keywords** : Kunitz trypsin inhibitor protein, P34 protein, allergen, soybean

콩 종실에는 유전자원에 따른 차이는 있으나 일반적으로 약 단백질 40%, 탄수화물 30%, 지방 20%, 기타 10%로 구성되어 있으며 인체 내에서 유익한 작용을 나타내어 콩의 가치를 높여주는 역할을 하는 기능성 물질들이 많이 포함되어져 있다. 대표적인 기능성 물질들에는 암세포 증식을 억제하는 Isoflavones, 항산화 및 항암작용을 하는 Anthocyanin, 당이 결합된 삼량체로 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 Saponin, 항암작용, 무기물의 흡수를 저해하는 Phytic acid 등이 있다. 하지만 이러한 기능성 물질들과는 달리, 인체 내에 부작용을 나타내어 콩의 품질을 저하시키는 물질들이 다수 포함되어져 있다.

콩의 성숙 종실에 함유되어져 있는 Kunitz trypsin inhibitor (KTI) 단백질은 181개의 아미노산으로 구성된 21.5 kDa의 단백질로(Kunitz, 1945), 12가지의 eletrophoretic forms을 가진다. 이러한 형태에는  $Ti^a$ ,  $Ti^b$ (Singh *et al.*, 1969),  $Ti^c$ (Hymowitz, 1973),  $Ti^d$ (Zhao and Wang, 1992),  $Ti^e$ (Wang *et al.*, 1996, 2001),  $Ti$ -null type(Orf and Hymowitz, 1979),  $Ti^f$ (Wang *et al.*, 2004),  $Ti^{bi5}$ (Wang and Li, 2005),  $Ti^{aa1}$ ,  $Ti^{aa2}$ ,  $Ti^{ab1}$ ,  $Ti^g$ (Wang *et al.*, 2008)가 알려져 있다. KTI 단백질은 Molecular linkage map A2(chromosome 8번)에 위치하는  $Ti$  유전자에 의해 조절되어지는데 recessive allele( $ti$ )일 경우 KTI 단백질이 유전적으로 결핍되어진 형태이며(Orf and Hymowitz, 1979), KTI 단백질이 결핍되어진 유전자원으로는 PI157440, PI196168등이 있다.

콩의 품질을 저하시키는 물질들 중 하나인 콩 알레르기는

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-55-772-1872 (E-mail) jongil@gnu.ac.kr  
<Received 16 February, 2012; Revised 7 March, 2012; Accepted 9 March, 2012>

지금까지 34개가 확인되었으며(Xiang *et al.*, 2008), 이들은 주로 아토피 반응이나 소화 억제와 같은 부작용을 일으킴으로 인해 오랫동안 식품 알레르기로 인식되어져 왔다(Sun, *et al.*, 2008). 주요 콩 알레르기인 P34 단백질은 Gly m Bd 30K로 불리며, predominant immunodominant allergen으로 확인되었다. 콩이 발아한 후 46 kDa의 precursor protein 으로부터 생성되어지는 P34 단백질은 258개의 아미노산으로 구성되어진 insoluble glycoprotein으로, 콩 저장 단백질인 7S globulin에 존재하는데 cotyledon 부분에 많이 존재하나 잎에는 거의 존재하지 않는다(Herman *et al.*, 2003). 이러한 P34 단백질은 protein folding 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 P34 단백질은 papain superfamily에 속하는 cysteine protease의 일종으로 papain protease와 유사한 sequence를 갖고 있긴 하지만 효소 활성은 나타내지 않으며, Catalytic cysteine residue가 glycine으로 대체되어있는 특이한 특징을 가진다(Kalinski *et al.*, 1992; Ji C., 1988). 이러한 P34 단백질은 IgE의 antibody로 작용하여 인체 내에서 알레르기 반응을 일으키는 것을 알려져 있다. 이전의 연구결과에 따르면 콩 알레르기 환자들의 65% 이상이 오직 P34 단백질에만 반응한다고 알려져 있다(Ogawa *et al.*, 1993; Helm *et al.*, 2000). 이는 34 kDa protein이 주요 allergen이며, 저자극성의 알레르기 반응을 일으키고 함량이 줄어든 콩 계통의 육성이 필요하며 P34 단백질을 적게 함유하는 유전자원으로 PI567476이 알려져 있다. 콩의 품질을 저하시키는 물질인 KTI 단백질이 결핍되고, P34 단백질을 적게 함유하는 콩 계통을 선발하기 위해서, 현재까지 밝혀져 있지 않은 KTI 단백질의 유무와 P34 단백질 함량간의 유전관계에 대한 정보를 얻기 위하여 본 연구가 진행되었다.

## 재료 및 방법

### 모본 및 교배

소화 억제 및 주요 콩 알레르기 물질인 Kunitz trypsin inhibitor(KTI) 단백질의 유무와 P34 단백질 함량간 유전양상을 파악하기 위한 F<sub>2</sub> 집단을 육성하기 위하여 KTI 단백

질 결핍 유전자원인 07B1과 P34 단백질 저함량 유전자원인 PI567476을 모본으로 선정하였다. 양 모본에 대한 몇 가지 형질은 Table 1과 같다.

선정된 두 모본 07B1과 PI567476 종자를 경상대학교 부속농장 온실에 각각 파종한 후 개화 시 두 모본을 교배하여 F<sub>1</sub> 종자를 수확하였다. 수확한 F<sub>1</sub> 종자를 다시 파종하였고, 잡종성이 검정된 F<sub>1</sub> 식물체에서만 F<sub>2</sub> 종자를 수확하였다. 수확한 F<sub>2</sub> 종자에 각각의 번호를 부여하였고, 양 모본 및 F<sub>2</sub> 종자를 대상으로 KTI 및 P34 단백질 분석에 이용하였다.

### Kunitz trypsin inhibitor 및 P34 단백질 분석

모본 및 수확한 F<sub>2</sub> 개개 종자를 대상으로 KTI 단백질 결핍 여부를 확인하기 위해서 SDS-PAGE 방법을 이용하였으며, P34 단백질 함량 여부를 확인하기 위해서 Western blot 방법을 이용하였다. 단백질을 추출을 위해 양 모본 및 F<sub>2</sub> 개개의 종자 자엽의 일부분을 잘라내어 종피를 제거한 다음 이를 1M Tris buffer(pH 8.0) 0.3 ml와 함께 막자사발을 이용하여 잘 갈아준 후 이를 다시 1.5 ml tube에 옮겨 15,000 rpm 4°C의 조건에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리된 내용물 중 가운데 맑은 층만을 다시 새 tube에 옮겨 이를 분석 재료로 사용하였다. SDS-PAGE 분석 과정으로 gel의 조건은 stacking gel의 경우 acrylamide 농도 4%, Tris buffer(pH 6.8)이었으며, running gel의 경우 acrylamide 농도 12%, Tris buffer(pH 8.8)이었다. 추출한 단백질 시료는 tube에 넣어 5X sample buffer 5 ul와 함께 혼합한 후 끓는 물에서 3분간 끓였다. 그리고 gel를 loading하였으며 loading 조건은 120V에서 8시간 30분이었다. 전기영동이 끝난 gel은 staining solution(0.25 g coomassie brilliant blue R250, 10% acetic acid, 45% methanol)에 염색시킨 후 destaining solution(10% acetic acid, 45% methanol)에 탈색시킨 후 21.5 kDa위치의 KTI 단백질을 확인하였다.

Western blot 분석 과정으로 단백질 시료를 UV- spectrophotometer를 사용하여 농도를 정량한 후 12% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 하였다. gel에서의 분리된 단백질을 PVDF membrane에 옮긴 후 2시간 동안 blocking buffer

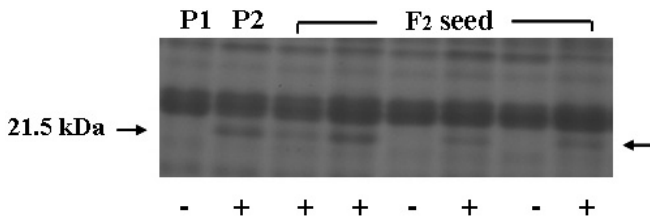
**Table 1.** Seed coat color, presence or absence of Kunitz trypsin inhibitor (KTI), genotype of *Ti* locus, amount of P34 protein and genotype of P34 locus of two parents used in this study.

Parents	Trait				
	Seed coat color	KTI protein	<i>Ti</i> genotype	P34 protein	P34 genotype
07B1	Black	Absent	<i>titi</i>	Normal	<i>P34P34</i>
PI567476	Yellow	Present	<i>TiTi</i>	Low	<i>p34p34</i>

(20 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 5% nonfat dried milk)에 담갔다. 이후 P34 antibody(Sung *et al.*, 2011)와 1시간 동안 반응시킨 후 TTBS buffer(20 mM Tris(pH7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 5분씩 3번 씻고, 2차 antibody와 1시간 동안 반응시켰다. 그런 후 다시 TTBS buffer에 5분씩 3번 씻은 후 ECL kit를 사용하여 X-ray film에서 P34 단백질 함량을 모본과 상대 비교 확인하였다. KTI 단백질 유무와 P34 단백질 함량간 독립 및 연관유전의 유전관계를 확인하기 위하여 Chi-square 방법을 이용하였다.

**결과 및 고찰**

양 모본의 교배로부터 전체 479개의 F<sub>2</sub> 종자를 얻었으며 모본 및 개개의 F<sub>2</sub> 종자에서 Kunitz trypsin inhibitor(KTI) 단백질은 Fig. 1과 같이 분리를 나타내었다. Fig. 1에서처럼 모본 07B1에는 KTI 단백질이 존재하지 않으며 PI567476 모본에서는 KTI 단백질이 존재하고 F<sub>2</sub> 개체별 종자는 KTI 단백질이 있는 것과 없는 것으로 분리되었다.



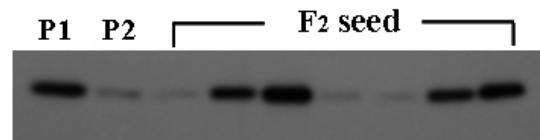
**Fig. 1.** Segregation of Kunitz trypsin inhibitor (KTI) protein in parent and F<sub>2</sub> seeds derived from the cross of 07B1 (P1) and PI567476 (P2).  
+,-: presence and absence of 21.5 kDa KTI protein.

전체 479개 F<sub>2</sub> 종자중에서 KTI 단백질이 존재한 종자는 353개, KTI 단백질이 결핍된 종자는 126개로 Chi-square 분석 결과  $\chi^2$  값은 0.435로 3 : 1의 비율과 일치하였다(Table 2).

이러한 결과는 이전의 연구자들이 보고한 결과와 일치하였다. Orf and Hymowitz(1979)은 Amsoy71 × PI157440, PI57440 × Amsoy71의 F<sub>2</sub> 종자에서 KTI 단백질이 존재하는 종자는 239개, KTI 단백질이 결핍된 종자는 81개로 3 : 1의 분리를 보고하였고, Kim *et al.*(2006)은 Clark × C242로 얻어진 F<sub>2</sub> 종자에서 KTI 단백질이 존재하는 종자의 수는 185개, 결핍된 종자의 수는 58개로 3 : 1의 분리비로 *Ti* 유전자는 single gene 유전법칙에 따른다고 보고하였다.

P34 단백질 함량이 보통(정상)인 07B1과 함량이 매우 적은 PI567476과의 교배로부터 얻어진 479개의 F<sub>2</sub> 종자에서 P34 단백질 함량은 모본의 형태와 같이 분리양상을 보였다 (Fig. 2).

Fig. 2에서처럼 07B1 모본은 보통 또는 높은 정도의 P34 단백질 함량을 나타내며 PI567476은 매우 낮은 P34 단백질 함량을 보인다. F<sub>2</sub> 종자에서는 양 모본의 경우와 같이 보통 또는 높은 함량을 가진 것과 낮은 함량을 가진 것으로 분리되었다. 전체 479개의 F<sub>2</sub> 종자에 대한 P34 단백질 함량 결과는 Table 3과 같다.



**Fig. 2.** Segregation of the P34 protein in F<sub>2</sub> seeds derived from the cross between 07B1 (P1) and PI567476 (P2). 07B1 has normal content of P34 protein and PI567476 has low content of P34 protein.

**Table 2.** Observed and expected segregation of Kunitz trypsin inhibitor (KTI) protein (*Ti* locus) in 479 F<sub>2</sub> seeds derived from the cross of 07B1 and PI567476.

KTI protein	No. of F <sub>2</sub> seeds		Expected ratio	$\chi^2$	P
	Observed	Expected			
Presence	353	359.25	3	0.435	0.510
Absence	126	119.75	1		

**Table 3.** Segregation of P34 protein content in F<sub>2</sub> seeds derived from the cross between 07B1 (normal content) and PI567476 (low content).

P34 protein content	No. of F <sub>2</sub> seeds		Expected ratio	$\chi^2$	P
	Observed	Expected			
Normal	363	359.25	3	0.157	0.692
Low	116	119.75	1		

**Table 4.** Independent inheritance between presence or absence of Kunitz trypsin inhibitor (KTI) protein and content of P34 protein in 479 F<sub>2</sub> seeds derived from the cross of 07B1 and PI567476.

Phenotype		No. of F <sub>2</sub> seeds		Expected ratio	$\chi^2$	P
KTI protein	P34 Protein	Observed	Expected			
Presence	Normal	266	269.4	9	3.31	0.346
Presence	Low	88	89.8	3		
Absence	Normal	102	89.8	3		
Absence	Low	23	29.9	1		

Table 3에서처럼 전체 479개 F<sub>2</sub> 종자 중에서 07B1 모본과 같이 P34 단백질 함량이 보통 혹은 높은 종자가 363개, PI567476 모본과 같이 낮은 종자는 116개로 Chi-square 분석 결과  $\chi^2$  값은 0.157로 기대되는 3:1의 비율과 일치하여 P34 단백질 함량은 single gene에 의해서 좌우되었다. 이러한 결과는 장려품종 x PI567476의 교배로부터 얻어진 418개의 F<sub>2</sub> 종자에서 P34 단백질 함량이 보통 혹은 높은 종자가 310개, 낮은 함량의 종자는 108개로 3:1의 분리비를 보고한 이전의 결과(Sung *et al.*, 2011)와 일치하였다.

Table 2에서 얻어진 KTI 단백질 유무에 대한 분리비 및 Table 3에서 나타난 P34 단백질 함량의 유전 분리비를 이용하여 KTI 단백질 유무와 P34 단백질 함량간 독립 및 연관 유전에 대한 Chi-square 분석 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서처럼 전체 F<sub>2</sub> 종자 479개 중에서 KTI 단백질이 존재하며, P34 단백질 함량이 보통 또는 높은 종자는 266개, KTI 단백질이 존재하고 P34 단백질 함량이 적은 종자가 88개, KTI 단백질이 결핍이고 P34 단백질 함량이 보통 또는 높은 종자가 102개, KTI 단백질이 결핍이며 P34 단백질 함량이 적은 종자가 23개로 분리되었다. Chi-square 검정 결과 9 : 3 : 3 : 1의 분리비와 일치하여 KTI 단백질 유무와 P34 단백질 함량간은 서로 독립적임을 나타내었다. 이는 KTI 단백질 유무를 조절하는 *Ti* 유전자는 콩 염색체 8번에 위치하므로 P34 단백질 함량을 결정하는 유전자는 8번 염색체가 아닌 다른 염색체에 위치함을 나타내었다. 본 연구의 결과 F<sub>2</sub> 종자 또는 분리 집단에서 KTI 단백질이 결핍되어 있고 P34 단백질 함량이 적은 종자 또는 계통은 독립유전의 법칙에 따라 6.25%가 존재하여 콩의 품질 및 영양성을 떨어뜨리는 이들 두 성분이 결핍 또는 감소된 계통의 선발이 용이할 것으로 보였다.

**적 요**

인체내에서 소화불량 및 알레르기 반응을 일으킴으로써 콩의 품질을 저하시키는 물질인 Kunitz trypsin inhibitor(KTI)

단백질이 결핍되고, P34 단백질을 적게 함유하는 콩 계통을 선발하기 위해서, 현재까지 보고되지 않은 KTI 단백질의 유무와 P34 단백질 함량간의 유전관계에 대한 정보를 얻기 위하여 본 연구에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 07B1과 PI567476의 교배를 통해 얻어진 479개의 F<sub>2</sub> 종자를 대상으로 SDS-PAGE를 이용한 KTI 단백질의 유무를 확인한 결과, KTI 단백질이 존재하는 종자의 수는 353개, 결핍된 종자는 126개로 3 : 1로 분리하였다.
- 2 Western blot을 이용한 P34 단백질의 함량을 확인한 결과, P34 단백질 함량이 보통 또는 높은 종자가 363개, 함량이 낮은 종자는 116개로 P34 단백질 함량에 대한 유전 분리비는 3 : 1로 나타났다.
3. 전체 F<sub>2</sub> 종자 479개 중에서 KTI 단백질이 존재하며, P34 단백질 함량이 보통 또는 높은 종자가 266개, KTI 단백질이 존재하고 P34 단백질 함량이 낮은 종자가 88개, KTI 단백질이 결핍이고 P34 단백질함량이 보통 또는 높은 종자가 102개, KTI 단백질이 결핍이며 P34 단백질 함량이 적은 종자가 23개로 9:3:3:1의 분리비에 적합하여 KTI 단백질 유무와 P34 단백질 함량간에는 독립유전을 하였다.

**사 사**

이 논문은 2010년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(번호:2010-0002513)결과의 일부이며, 연구 지원에 감사드립니다.

**인용문헌**

Helm, R. M., Cockrell, G., Connaughton, C., West, C. M., Herman, E., Sampson, H. A., Bannon, G. A., and Burks, A. W. 2000. Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of P34/Gly m Bd 30K. *J. Allergy Clin Immuno.* 105 :

- 378-384.
- Herman, E. M., Helm, R. M., Jung, R., and Kinney, A. L. 2003. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiology* 132 : 36-43.
- Hymowitz T. 1973. Electrophoretic analysis of SBTI-A2 in the USDA soybean germplasm collection. *Crop Sci* 13 : 420-421.
- Ji C, Boyd C, Slaymaker D, Okinaka Y, Takeuchi Y, and Midland, S. L. 1988. Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95 : 3306-3311.
- Kalinski, A., Melroy, D. L., Dwivedi, R. S., and Herman, E. M. 1992. A soybean vacuolar protein (P34) related to thiol proteases is synthesized as a glycoprotein precursor during seed maturation. *J.Bio. Chem.* 267 : 12068-12076.
- Kim, M. S., M. J. Park, W. H. Jeong, K. C. Nam and J. I. Chung. 2006. SSR marker tightly linked to the *Ti* locus in soybean. *Euphytica* 152 : 361-366.
- Kunitz, M. 1945. Crystallization of a soybean trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101 : 668-669.
- Ogawa, T., Tsuji, H., Kitamura, K., Zhu, Y. L., Hirano, H., and Nishikawa, K. 1993. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 : 1030-1033.
- Orf, J. H., and Hymowitz, T. 1979. Inheritance of the absence of the Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans. *Crop Sci.* 19 : 107-109.
- Singh, L. C., Wilson, M., and Hadley, H. H. 1969. Genetic differences in soybean trypsin inhibitor separated by disc electrophoresis. *Crop Sci* 9 : 489-491.
- Sun, P., Li, D. F., Li, Z. J., Dong, B., and Wang, F. L. 2008. Effects of glycinin on IgE mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 627-633.
- Sung, M. K., J. S. Seo, K. R. Kim, E. H. Han, J. W. Nam, D. S. Kang, W. S. Jung, M. C. Kim, S. I. Shim, K. M. Kim and J. I. Chung. 2011. Inheritance of P34 allergen protein in mature soybean seed. *Kor. J. Breed. Sci.* 43(2) : 115-119.
- Wang, K. J., Kaizuma, N., Takahata, Y., and Hatakeyama, S. 1996. Detection of two new variants of soybean Kunitz trypsin inhibitor through electrophoresis. *Breed Sci* 46 : 39-44.
- Wang, K. J., Takahata, Y., Ito, K., Zhao, Y. P., Tsutsumi, K. I., and Kaizuma, N. 2001. Genetic characterization of a novel soybean Kunitz trypsin inhibitor. *Breed Sci* 51 : 185-190.
- Wang, K. J., Yamashita, T., Watanabe, M., and Takahata, Y. 2004. Genetic characterization of a novel *Ti<sup>b</sup>*-derived variant of soybean Kunitz trypsin inhibitor detected in wild soybean (*Glycine soja*). *Genome* 47 : 9-14.
- Wang, K. J., and Li, X. H. 2005. Tif type of soybean Kunitz trypsin inhibitor exists in wild soybean of northern China. In: *Proceedings of the 8th national soybean research conference of China*, pp. 167-168.
- Wang, K. J., Takahata, Y., Kono, Y., and Kaizuma, N. 2008. Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*). *Theor Appl Genet.* 117 : 565-573.
- Xiang, Baird, L. M., Jung, R., Zeece, M. G., Markwell, j., and Sarath, G. 2008. P34, a novel soybean protein allergen, belong to a plant-specific protein family and is present in protein storage vacuoles. *J Agric. Food. Chem.* 56 : 2266-2272.
- Zhao, S. W., and Wang, H. 1992. A new electrophoretic variant of SBTi-A2 in soybean seed protein. *Soyb Genet Newsl.* 19 : 22-24.