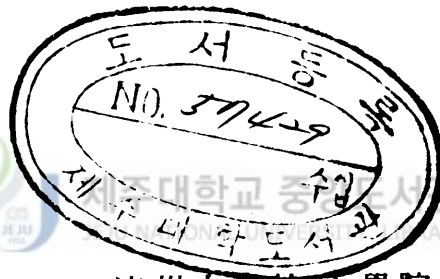


17
489.57
02838
=2

석사학위논문

해녀콩 종자에서

Trypsin Inhibitor의 부분정제 및 특성



濟州大學校 天學院
生物學科


梁 斗 榮

1996년 12월

해녀콩 종자에서
Trypsin Inhibitor의 부분정제 및 특성

指導教授 : 高 碩 贊

梁 斗 榮


 제주대학교 중앙도서관
이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

1996年 12月

양두영의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 印

위 원 _____ 印

위 원 高 碩 贊 


濟州大學校 大學院

1996年 12月

**Partial Purification and Properties
of Trypsin Inhibitors from the seeds
of *Canavalia lineata***

Doo-Young YANG

(Supervised by professor **Suck-Chan Koh**)

 제주대학교 중앙도서관
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

	page
ABSTRACT	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	5
III. 결과 및 고찰	9
적요	20
참고문헌	21
감사의 글	24

ABSTRACT

The trypsin inhibitors were partially purified and characterized from the seeds of *Canavalia lineata*.

The trypsin inhibitors were partially purified by acid precipitation, acetone precipitation and Sephacryl S-100 chromatography and separated into four different ones(IV-2, III-1 and III-2) by DEAE-Sephacel ion exchange chromatography. The purification of them were 84.5-(III-1), 63.4-(III-2), 14.1-(IV-1) and 276.1-fold(IV-2) respectively.

The molecular weights of trypsin inhibitors were estimated to be 18.6 kD(III-1), 11.3 kD(IV-1) and 15.1 kD(IV-2) respectively by Sephacryl S-100 gel chromatography. The K_{m_i} values for inhibition of trypsin by these trypsin inhibitors were estimated to be 2.31 mM(III-1), 1.20 mM(III-2), 0.53 mM(IV-1) and 4.87 mM(IV-2) respectively and the V_{max_i} values were 244.2 unit(III-1), 198.4 unit(III-2), 138.7 unit(IV-1) and 327.4 unit(IV-2) respectively. These results suggest that III-1 is noncompetitive, III-2 and IV-1 are uncompetitive and IV-2 is competitive.

All of these trypsin inhibitors inhibited not only trypsin but also chymotrypsin, although they showed remarkable selectivity for these protease depending on substrates. However, chymotrypsin was more inhibited than trypsin by III-2 whereas trypsin was further more inhibited than chymotrypsin by IV-2 when azocasein was used as a substrate. These results suggest that IV-2 is a Bowman-Birk type and the others(III-1, IV-1 and III-2) are Kunitz-types.

I. 서론

Protease inhibitor들은 protease가 기질과 반응할 때 protease의 특정 부위와 결합하여 활성을 억제하는 물질로 protease가 기질과 결합할 수 없도록 먼저 protease와 결합을 하거나 protease와 기질이 결합한 후 이 결합체에 다시 결합하여 생성물의 형성을 방해하는 방법으로 protease의 활성을 억제한다 (Barrett, 1980; Bewley and Black, 1978). 이들은 동·식물, 미생물 등에 광범위하게 분포되어 있으며 거의가 단백질로 알려져 있다(Toshi *et al.*, 1991). 동·식물로 부터 발견된 다수의 protease inhibitor들은 산 및 열에 비교적 안정한 저분자(분자량 6 kD~12 kD)와 열에 불안정한 고분자(분자량 20 kD~60 kD)로 대별되고(Kassell, 1976), 또한 protease의 유형에 따라서 각기 다른 여러 형태의 억제 기작을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.

식물에는 많은 종의 쌍자엽식물 종자에 protease의 작용을 억제하는 inhibitor 단백질이 존재하고 있으며, 특히 콩과, 가지과 식물의 종자나 괴경과 같은 저장 기관에 많은 것으로 알려지고 있다(Ryan, 1981). Inhibitor 단백질의 생리적인 역할에 대하여는 곤충이나 동물 또는 미생물의 식작용에 대한 방어 기능, endogenous proteinase에 의한 단백질 분해의 조절, 저장 단백질로서의 기능 등이 있는 것으로 알려지고 있다(Wilson *et al.*, 1985). 이들의 상세한 생리적 기능은 아직 정확히 구명되지는 않았으나 생체 내에서의 주된 역할은 비정상적인 proteolysis를 방지하는 것으로 알려져 있고(Laskowaski and Kato, 1980), 혈장 내에서 혈액응고, 섬유소 분해 등에 관련이 있다(Fritz *et al.*, 1984). 특히 식물보다는 동물의 protease에 강한 억제 현상을 보이는데 주로 소화기 계통에 작용한다고 보고되고 있다(Ryan, 1973). 식물의 inhibitor 단백질 중에 잘 알려진 것 중에 하나가 trypsin inhibitor로서 식물체 내에 존재하는 trypsin-like enzyme의 작용과 관계가 있다는 주장도 있어 왔고(Shain and Mayer, 1968), endogenous proteinase의 작용을 억제하지 않는다는 보고도 있으나(Baumgartner and Chrispeels, 1976), 근래에는 trypsin inhibitor가 동물의

소화 효소인 trypsin을 강하게 억제하므로 식물의 방어 물질로 고려되고 있다 (Ryan, 1981).

Protease inhibitor의 구조와 특성에 대한 연구는 X-선 회절 분석과 같은 방법으로 이루어지고 있는데, 식물에서는 L-아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 전형적인 폴리펩타이드 구조를 가지며 일반적으로 half-cystine 잔기들과 교차되어 연결된 disulfide 결합을 갖는다(Laskowski et al., 1978). 대두의 경우에는 많은 protease inhibitor가 있으며 이를 Kunitz형(2 개의 disulfide을 갖는 single polypeptide chain, 분자량 21.5 kD)과 Bowman-Birk형(7 개의 disulfide 결합에 의해 교차 연결된 single chain, 분자량 8 kD)으로 나눈다. 이들은 활성 부위의 아미노산 서열이 달라 Kunitz형은 활성 부위가 한 개로 그 주변의 sequence가 Arg-Ile-Arg-Phe- 를 갖는 반면, Bowman-Birk형은 두개의 활성 부위가 있으며 기질에 따라 부위가 다른데 trypsin의 결합 부위는 Lys-Ser, chymotrypsin의 결합 부위는 Leu-Ser의 sequence를 갖는다. Bowman-Birk형이 trypsin과 chymotrypsin 모두에 대하여 강한 억제 활성을 보인다는 것도 이러한 활성 부위를 갖는데 기인한다고 보고 있다(Odani and Ikenaka, 1972). 이와 같은 억제 물질의 작용 기작과 대사에 관한 연구는 trypsin 저해 물질이 소염작용, 변이유발 저지 및 암전위 저지 등에 이바지 할 수 있을 것으로 기대되고 있으며, 체액중의 protease의 식별, affinity chromatography의 활성기 또는 복잡한 생체 반응에 관여하는 protease의 기능을 해석하는 시약으로 이용되는 등 활용의 범위가 넓어지고 있어서(Umezawa, 1972) 이에 대한 연구가 더욱 필요하다.

한편, *Canavalia*속 식물은 lectin의 일종인 concanavalin A(Con A)와 비단백성 아미노산인 canavanine을 함유하고 있어 연구가 활발히 진행되고 있다. Con A는 적혈구 뿐만 아니라 다양한 세포를 응집하는 성질을 가진 lectin의 일종으로 당단백질과 결합할 수 있는 특이성을 갖고 있으며(Richard, 1981) 성숙한 종자 내의 endopeptidase에 저항성을 가진다(Karen et al., 1983). Canavanine은 arginine의 guanidino-oxy 유사체로서 concanavalin A와 더불어 박테리아는 물론 고등 동·식물에 이르는 여러 생물에서 대사 저해 작용을 나타낸다(Rosenthal, 1977,1982). Canavanine 함유량은 종에 따라 변이가 있으나(Rosenthal, 1982), jack bean(*C. ensiformis*)인 경우 전 질소량의 55% 혹은 모

든 유리 아미노산의 95%를 차지하며(Rosenthal and Jansen, 1983) 곤충을 포함한 많은 생물에 독성을 나타내어 타감작용 물질로 작용하는 것으로 보고되고 있다(Rosenthal, 1977). 그러나, canavanine과 같이 타감작용 물질로 작용할 수 있는 protease inhibitor에 대한 연구는 아직까지 진행된 바가 없다. 국내에는 *Canavalia*속 식물로는 유일하게 해너콩(*C. lineata*)이 제주도에 자생하며 canavanine 대사와 protease에 대한 연구가 진행된 바 있다(kwon *et al.*, 1986; Yoon and Kwon, 1993; Koh *et al.*, 1993, 1994). 특히, 해너콩 유식물 자엽에 존재하는 BApNAase는 trypsin과는 성질이 다르나 serine protease로 밝혀졌으며(Koh *et al.*, 1994) BApNAase와 종자 내의 trypsin inhibitor와의 관계를 밝힐 필요가 있으며 Con A는 발아 8일 이후 대부분 생장에 이용되는데 종자 내의 trypsin-like protease에 의해서는 분해되지 않으나 포유동물의 trypsin과 chymotrypsin에 의해 쉽게 분해되며 이러한 Con A의 분해가 trypsin inhibitor에 의해 억제되는 것으로 알려져 있어(Koh, 1990) 포유동물의 소화와 관련하여 protease와 trypsin inhibitor와의 관계에 대한 연구가 더 많이 요구되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 해너콩 종자 내에 존재하는 trypsin inhibitor들을 부분정제하고 분리된 trypsin inhibitor들의 특성을 비교하며, trypsin과 chymotrypsin에 대한 억제 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 해너콩(*Canavalia lineata*) 종자는 제주도 다려도에서 채취하여 상온에 보관하면서 사용하였다.

2. Trypsin inhibitor의 추출

종자에 존재하는 trypsin inhibitor의 추출은 Richard의 방법(1991)으로 종자 당 10 mL의 0.1 M borate 완충용액(pH 8.0)과 약간의 석영사를 넣고 마쇄한 후 4℃에서 10,000 x g로 30 분간 원심분리하여 상정액을 취하고, 상정액을 80℃에서 10 분간 끓인 후 4℃에서 10,000 x g로 30 분간 원심분리하여 얻은 상정액을 시료로 사용하였다. 그리고 Protease inhibitor가 열에 강한 특성을 이용하여 80℃에서 10 분 동안 열처리를 하였다.

3. Trypsin inhibitor의 부분정제

Trypsin inhibitor 분리는 산 침전법, 아세톤 침전법, Sephacryl S-100 겔 여과 크로마토그래피, DEAE-Sephacel G-100 이온 교환 크로마토그래피로 분리하였고, 이들 전 과정은 4℃에서 수행하였다.

Trypsin inhibitor 시료 용액 100 mL에 0.1 M HCl을 첨가하면서 pH를 5.0으로 조정 한 후 10,000 x g로 30 분간 원심분리하여 산성 조건에 침전되는 단백질을 제거시키고 상정액에 1 M NaOH를 가하면서 pH를 8.0으로 조정한 뒤 원심분리하여 상정액을 취하였다. 산 침전법에서 얻은 시료에 아세톤을 소량씩 첨가하면서 아세톤 농도가 40%가 되도록 한 후 원심분리하여 상정액을 얻고 아세톤 농도가 80%가 되도록 아세톤을 첨가한 후 다시 원심분리하여 침전물을 얻었다.

이들 침전물은 0.1 M borate 완충용액(pH 8.0) 30 mL로 녹였다. 아세론 침전에 의해 얻은 용액은 0.1 M borate 완충용액(pH 8.0)으로 평형시킨 Sephacryl S-100 컬럼(ϕ 2.6 cm \times 95 cm)에 loading하여 동일한 완충용액으로 용출시켰다. 이때 분획 당 용출량은 6 mL이고 시간당 용출 속도는 시간당 5 mL로 하였다. 각 분획의 trypsin inhibitor 활성을 측정하고 활성이 높은 분획을 모아 다음 단계에 이용하였다. 위의 과정에서 얻은 trypsin inhibitor 분획을 0.1 M borate 완충용액(pH 8.0)으로 평형시킨 DEAE-Sephacel 컬럼(ϕ 1.6 cm \times 8.1 cm)에 loading하고 동일 완충용액 100 mL로 씻어 준 후, 100 mL의 동일한 완충용액(NaCl의 농도 기울기: 0~0.1 M)으로 용출시켰다. 이때 각 분획 당 용출량은 5 mL 이고 용출 속도는 시간 당 15 mL로 하였다. 각 분획별 inhibitor 활성을 측정하여 활성이 높은 분획들을 모아 trypsin inhibitor의 특성을 조사하였다.

4. 단백질 함량 측정

단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 즉, 시료 0.5 mL에 10% trichloroacetic acid(TCA)를 0.5 mL을 가하고 10,000 x g에서 10 분 동안 원심분리하여 단백질을 침전시키고, 침전물에 0.5 mL의 1 N NaOH를 가한 후 0.098 N NaOH, 1.96% Na₂CO₃, 0.027% Na, K-tartrate, 0.01% CuSO₄를 포함하는 용액 3 mL 과 0.5 mL phenol reagent를 혼합하여 실온에서 30 분간 반응시킨 뒤 700 nm에서 흡광도(OD)를 측정하고, bovine serum albumin(BSA)를 표준시료로 하여 단백질 함량을 산출하였다. 다만, DEAE-Sephacel S-100 이온 교환 크로마토그래피로 분리된 III-1, III-2, IV-1 그리고 IV-2 분획의 단백질 함량은 Schleif와 Wensink(1981)의 방법으로 280 nm와 260 nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 산출하였다.

5. Trypsin inhibitor 활성 측정

Trypsin inhibitor의 활성은 Nielsen과 Liener(1984)의 방법을 토대로 실

시하였다. 즉, 0.18 M Tris-HCl 완충용액(pH 9.0) 1 mL, 180 mM CaCl₂ 0.2 mL, 9 µg/mL의 trypsin 0.2 mL, inhibitor 추출액 0.2 mL, 그리고 9 mM N α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide(BAPNA) 0.2 mL을 혼합한 후 40°C 항온조에서 1 시간 30 분 동안 반응시키고 30% acetic acid 0.5 mL을 가하여 반응을 중지 시킨 다음 410 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 활성은 1분당 흡광도(OD) 0.01의 억제를 1 unit로 산출하였다.

6. 전기영동 및 trypsin inhibitor의 선별 염색

전기영동은 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 native 조건에서 실시하였고, SDS가 제거된 15% polyacrylamide 겔과 0.025 M Tris-0.192 M glycine 전극조 완충용액(pH 8.3)을 사용하였으며 30µL의 시료를 loading하여 4°C에서 100 V로 6 시간 동안 정전압을 걸어 주어 분리하였다. Trypsin inhibitor의 염색은 1968년 Uriel과 Berges가 실시한 방법을 변형하여 실시하였다(Chan and Lumen, 1982). 즉, 전기영동이 끝난 겔을 trypsin(0.2 mg/mL)이 포함된 0.1 M Na-phosphate 완충용액(pH 7.4)에 담가 35°C에서 30 분간 반응시킨 후 증류수로 2 회 세척하고, 5 mg/mL의 N-acetyl-DL-phenylalanine β -naphthyl ester(APNE)와 20 mg/mL의 Fast blue B salt가 들어 있는 0.02 M Na-phosphate 완충용액(pH 7.4)에 옮겨 35°C에서 30 분 동안 발색시켰다.

7. Trypsin inhibitor의 분자량 측정

부분 정제한 각 trypsin inhibitor의 분자량은 Sephacryl S-100 겔 컬럼에 loading하여 분리 과정에서 이용한 방법과 동일하게 실시하여 산출하였다. 이때 분자량의 지표는 β -amylase(200 kD), albumin(66 kD), carbonic anhydrase(29 kD), riboflavin(376 D)을 사용하였다.

8. 단백질 분해 효소에 대한 trypsin inhibitor의 억제 능력 측정

분리한 trypsin inhibitor의 단백질 분해 효소에 대한 억제 능력을 알아보기 위하여 trypsin과 chymotrypsin을 이용하였고, trypsin의 기질로는 BAPNA와 azocasein을 chymotrypsin의 기질로는 N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE)와 azocasein을 이용하여 활성을 측정하였다. 이들 활성 측정은 trypsin inhibitor의 활성 측정 방법을 토대로 분해 효소와 기질만을 달리하여 실시하였다. 다만, azocasein을 기질로 한 경우는 BAPNA 대신에 2% azocasein을 0.2 mL을 넣고 1 시간 30 분 동안 반응시키고 난 후 30% acetic acid 0.5 mL을 가하여 원심분리하고 상징액의 흡광도(OD)를 340 nm에서 측정하였고, BTEE를 기질로 한 경우는 0.75 mM BTEE가 들어 있는 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)완충용액 1 mL, 75 mM CaCl₂ 0.2 mL, inhibitor용액 0.1 mL 그리고 5 µg/mL chymotrypsin 0.2 mL을 넣고 반응시킨 직후 10 분 동안 400 nm에서 흡광도(OD)를 monitoring하여 활성을 산출하였다.



III. 결과 및 고찰

1. Trypsin inhibitor의 전기영동 패턴

해너콩(*C. lineata*)의 자엽 내에 존재하는 trypsin inhibitor의 polyacrylamide 겔 전기영동 패턴을 조사하였다. 그 결과, 해너콩의 trypsin inhibitor 밴드는 5 개로 확인되었으며 대두의 밴드 양상과는 달랐다(Fig. 1).

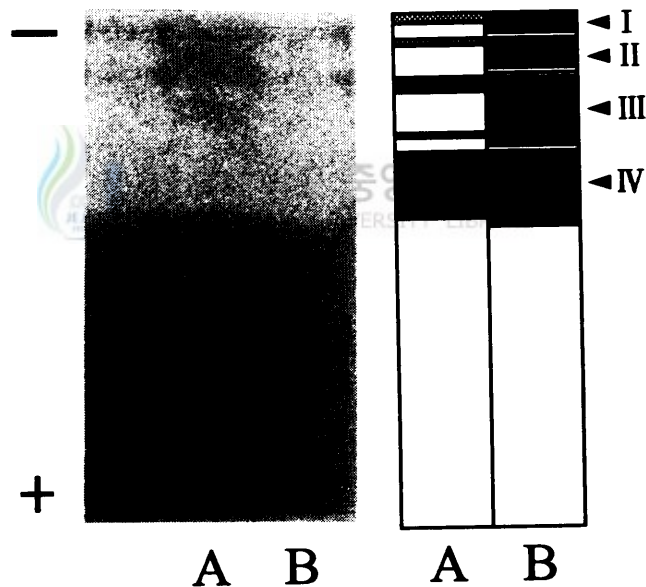


Fig. 1. PAGE patterns of trypsin inhibitors in the seeds of *Canavalia lineata*(A) and *Glycine max*(B).

I ~ IV represent the protease inhibitor groups in terms of increasing mobility toward the anode. Thirty micro liter of unboiled crude extract was directly loaded on the well.

그러나 대두의 trypsin inhibitor들을 전기 이동도에 따라 I, II, III, IV 그룹으로 구분하였을 때, 해너콩의 trypsin inhibitor 밴드 5개의 전기 이동도는 대

두의 trypsin inhibitor 4 개의 그룹과 부분적으로 일치하였다. 즉, 해너콩 종자의 trypsin inhibitor 밴드는 대두의 그룹 I에 1 개, 그룹 II에 1 개, 그룹 III에 2 개, 그룹 IV에 1 개의 밴드가 일치함을 알 수 있으며 그룹 III과 IV가 상대적으로 높은 활성을 보였다.

또한 종자 1 개를 기준으로 하여 해너콩과 대두의 inhibitor 활성을 비교하여 보았을 때 전체적으로 inhibitor 밴드의 활성은 해너콩이 대두에 비하여 현저히 낮은 결과를 보였다. 이러한 결과는 해너콩 종자가 대두보다 훨씬 크다는 점을 감안하였을 때 해너콩 종자의 inhibitor의 함량은 대두에 비하여 대단히 적게 분포함을 알 수 있다.

2. Trypsin inhibitor의 부분정제

해너콩의 자엽 내에 존재하는 trypsin inhibitor들을 정제하기 위하여 산 침전법, 아세톤 침전법, Sephacryl S-100 겔 여과 크로마토그래피, DEAE-Sephacel 이온 교환 크로마토그래피를 실시하였다(Table 1). 그 결과, 산 침전

Table 1. Purification of trypsin-inhibitors from the seeds of *Canavalia lineata*.

Procedure	Total activity (unit ¹⁾)	Total protein (mg)	Specific activity (unit ¹ /mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	ND ²⁾	143.50	-	-	-
Heat precipitation	72.1	102.0	0.71	100.0	1.0
Acid precipitation	39.2	81.40	0.48	54.4	0.7
Acetone precipitation	9.5	4.88	1.95	13.2	2.8
Sephacryl S-100	8.1	0.30	27.0	11.2	38.0
DEAE-Sephacel G-100					
IV-1	1.5	0.15	10.0	2.1	14.1
IV-2	5.9	0.03	196.0	8.2	276.1
III-1	1.2	0.02	60.0	1.7	84.5
III-2	0.9	0.02	45.0	1.3	63.4

¹⁾ One trypsin-inhibitor unit was defined as $\Delta 0. D_{410} 0.1/\text{seed}$ under the assay condition.

²⁾ ND : No detection.

법에 의하여 20.2%의 단백질이 제거되었고 trypsin inhibitor 활성도는 54.4%로 낮아져 pH의 변화에 민감한 일부 inhibitor가 소실되었다. 아세톤 침전에 의해 단백질의 함량은 자엽 당 4.88 mg으로 전체 함량의 3.4%가 남아 있어 대부분의 단백질이 제거되었으나, inhibitor의 활성도 전체 활성의 13.2%로 상당량 소실되었다. 다음 단계의 Sephacryl S-100 겔 여과 크로마토그래피에 의하여 하나의 주요 peak와 4~5 개의 미세한 peak로 분리되었고(Fig. 2), 주요 peak인 28~35

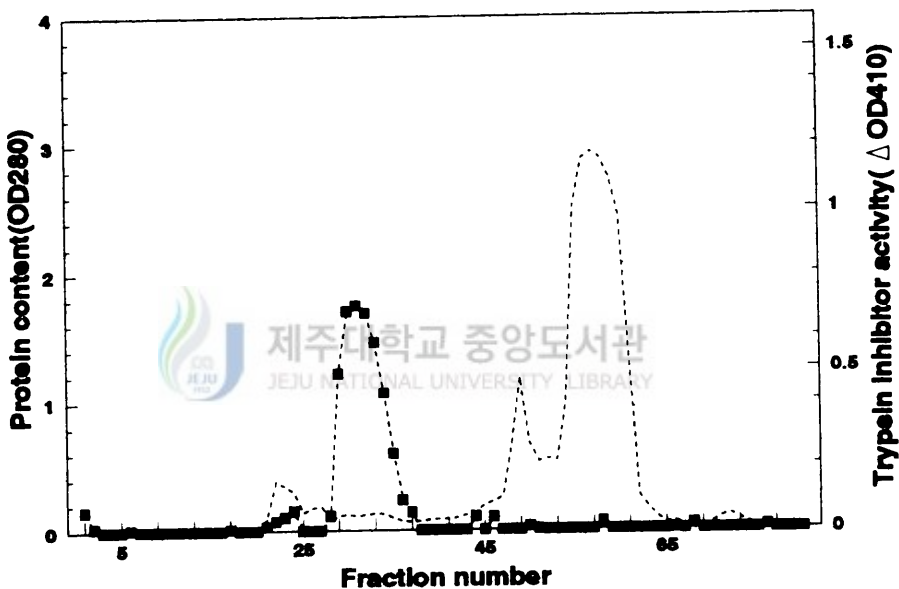


Fig. 2. Elution profile of trypsin inhibitor from Sephacryl S-100 column.

The active fraction from acetone precipitation was applied to a Sephacryl S-100 column. Proteins(.....) were eluted 5 ml/fraction and trypsin inhibitor activity(-■-) was measured as described in the text.

번 분획의 specific activity가 27.0으로 높아 대부분의 단백질이 제거되었다. 겔 여과 크로마토그래피로 분리해 낸 trypsin inhibitor분획을 모아 DEAE-Sephacel G-100 이온 교환 크로마토그래피를 실시한 결과 4 개의 trypsin inhibitor로 분리되었다(Fig. 3). 즉, 5~15번 분획(IV-1), 15~35번 분획(IV-2),

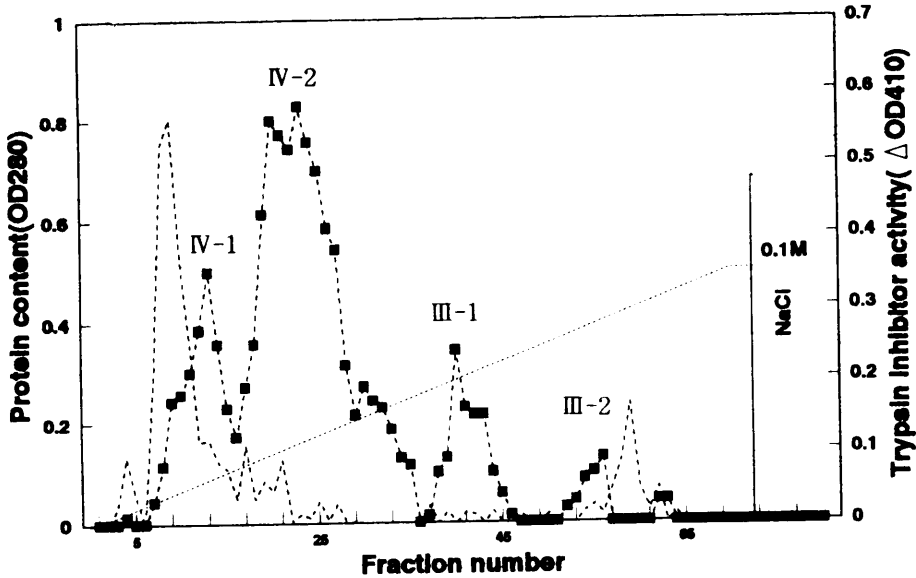


Fig. 3. Elution profile of trypsin inhibitor from DEAE-Sephacel G-100 column.

The extract isolated from Sephacryl S-100 chromatography was applied to DEAE-Sephacel G-100 column. Proteins(.....) were eluted 6 ml/fraction and trypsin inhibitor activity(-■-) was measured as described in the text.

86~44번 분획(III-1) 그리고 51~56번 분획(III-2)에서 활성 peak를 나타냈다. 이들 분리된 trypsin inhibitor 중에서 IV-2가 정제도와 회수율이 각각 276.1과 8.2%를 보여 정제 정도가 가장 양호하였으나, III-2는 1.3%의 회수율을 보여 가장 낮았고 IV-1는 정제도가 14.1로 가장 낮았다. 또한 IV-2인 경우 자엽 당 0.03 mg를 함유하여 III-1과 III-2와 유사하였으나 specific activity가 196.0 unit/ 로 아주 높았다.

한편, trypsin inhibitor의 정제 과정과 부분 정제된 4 종류의 trypsin inhibitor의 전기영동 양상을 보면 이들 단백질이 그룹 III에서 2 개의 밴드(III-1과 III-2)로, 그룹 IV에서 2 개의 밴드(IV-1과 IV-2)로 분리되었다(Fig 4). 그러나 Fig 1에서 그룹 I과 그룹 II의 trypsin inhibitor들은 열과 산 처리 이후 소실되어, 그룹 I과 그룹 II는 외부 요인에 민감한 것으로 판단된다. 이에 반하여 IV그룹의 IV-1과 IV-2는 지속적으로 활성을 유지하고 있어 다른 trypsin inhibitor에 비하여 안정성이 상대적으로 높은

것으로 판단된다. 또한 IV-2는 열·산 등 외부적인 요인에 대해 안정성이 높을 뿐만 아니라 극히 적은 함량으로도 매우 높은 활성을 갖는 것으로 보아 해녀콩 종자에서 단백질 분해 효소에 대한 trypsin inhibitor의 주된 역할을 수행하는 것으로 판단된다.

3. Trypsin inhibitor의 특성

분리의 단계를 거쳐 부분정제된 4 개의 trypsin inhibitor를 가지고 그 특성을 비교하기 위해 각각의 분자량과 기질 친화도에 미치는 영향 그리고 protease별 기질에 대한 억제 능력을 살펴보면 다음과 같다.

Sephacryl S-100 겔 크로마토그래피를 통하여 얻어진 각 trypsin inhibitor의 분자량은 18.6 kD(III-1), 11.3 kD(IV-1), 15.1 kD(IV-2)을 보여 대부분이 10~20 kD 사이의 크기를 갖고 있었다(Fig. 5). III-2는 분자량을 측정할 수 없었으나 정제 과정

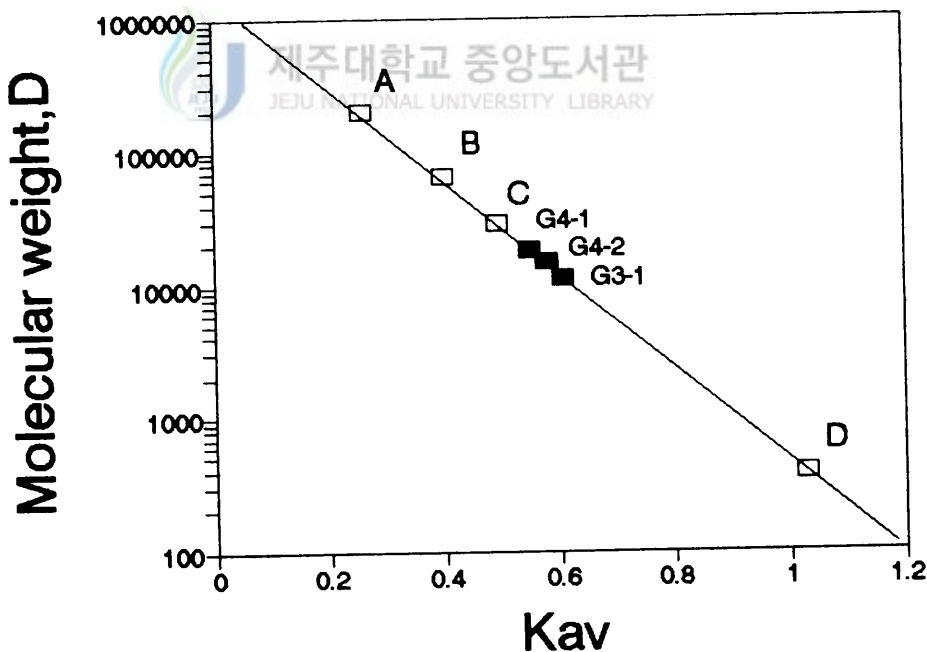


Fig. 5. Molecular weight estimation of the trypsin inhibitors by Sephacryl S-100 chromatography.

A to D represent β -amylase(200,000 D, A), albumin (66,000 D, B), carboxy anhydrogenase(29,000 D, C), and riboflavin(400 D, D), respectively.

에서 Sephacryl S-100 겔 크로마토그래피에서 주요 peak인 28~35번 분획에 포함되므로 이 역시 10~20 kD의 크기를 가질 것으로 판단된다. 이는 일반적으로 protease inhibitor의 크기가 8 kD~20 kD인 특성과 일치된다(Laskowski *et al.*, 1978).

분리한 trypsin inhibitor가 trypsin과 기질과의 친화도에 끼치는 영향을 알아보기 위하여 기질의 농도를 달리하여 trypsin활성을 측정하고 Lineweaver-Burk plot을 작성한 결과, 분리한 trypsin inhibitor들은 기질에 대한 친화도와 반응 속도에 있어서 각기 다른 억제 기작을 보여주었다(Fig. 6). 즉, inhibitor가 없을

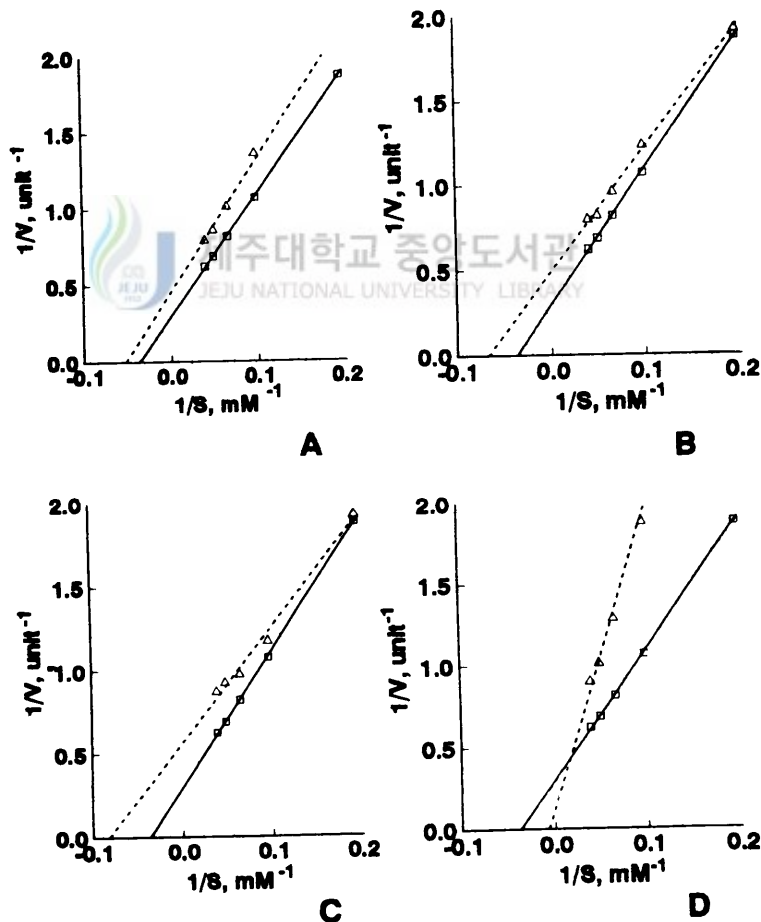


Fig. 6. Lineweaver-Burk plots of trypsin in the presence (- Δ -) and the absence(- \square -) of the trypsin inhibitors.

A: III-1

B: III-2

C: IV-1

D: IV-2

때 trypsin의 K_m 값은 2.35 mM이었으나, inhibitor를 첨가했을 때 K_m 값은 2.31 mM(III-1), 1.20 mM(III-2), 0.53 mM(IV-1), 4.87 mM(IV-2)를 나타내었고, V_{max} 값은 inhibitor가 없을 때 31.1 unit, inhibitor를 첨가했을 때 V_{max} 값은 244.2 unit(III-1), 198.4 unit(III-2), 138.7 unit(IV-1), 327.4 unit(IV-2)을 나타냈다. 이들의 저해 기작을 보면 trypsin inhibitor가 없을 때의 K_m 값, V_{max} 값을 비교하여 보면 III-1은 K_m 값은 비슷하나 V_{max} 값은 낮아 비경쟁적인 억제제를 보였고, III-2 와 IV-1은 K_m 값과 V_{max} 값 모두 낮은 결과를 나타내 반경쟁적 저해를 보였으며 IV-2는 K_m 값은 높고 V_{max} 값은 비슷하게 나타나 경쟁적 저해를 보이는 것으로 판단되었다.

한편, trypsin과 chymotrypsin에 대한 trypsin inhibitor의 억제 특성을 알아보기 위하여 기질을 달리하여 억제 활성을 조사하였다(Table 2). 그 결과,

Table 2. Inhibition of trypsin and chymotrypsin by the purified trypsin inhibitors.

Protease	Substrate	Trypsin inhibitor activity, unit*			
		III-1	III-2	IV-1	IV-2
Trypsin	BAPNA	13.0	3.3	1.2	10.1
	Azocasein	19.5	6.6	2.1	30.3
Chymotrypsin	BTEE	13.0	1.7	3.3	65.5
	Azocasein	21.2	11.8	2.3	2.7

* The units of trypsin inhibitor activity defined as ΔOD_{410} 0.1/mg protein for BAPNA, ΔOD_{340} 0.1/mg protein for Azocasein and ΔOD_{400} 0.1/mg protein for BTEE, respectively.

정도의 차이는 있으나 분리된 모든 trypsin inhibitor가 trypsin과 chymotrypsin 모두에 억제 작용을 보였고 이들의 억제 활성은 사용된 기질에 따라서는 차이가 있었다. 즉, trypsin에 대한 trypsin inhibitor의 억제 활성은 BAPNA를 기질로 하였을 때 III-1과 IV-2가 높게 나타났으나 III-2 와 IV-1에서는 낮게 나타났다. Azocasein을 기질로 했을 때는 IV-2에서 가장 높게 나타났으며 III-1

은 IV-2의 2/3 크기를 보였고, III-2 와 IV-1에서는 BAPNA를 기질로 하였을 때와 마찬가지로 낮았다. 또한 chymotrypsin에 대한 억제 활성은 BTEE를 기질로 하였을 때 IV-2에서 가장 높게 나타났으며 III-1은 1/5크기를 보였고, III-2 와 IV-1은 trypsin에서 azocasein을 기질로 했을 때와 비슷한 억제 활성을 보였으나 azocasein을 기질로 했을 때는 III-1과 III-2가 억제 활성이 높았으며 IV-1과 IV-2에서 낮았다. Azocasein을 기준으로 하여 trypsin과 chymotrypsin을 서로 비교해 보면 trypsin에서 III-1은 억제 활성이 비슷한 크기로 높게 나타났으나 IV-1은 비슷한 크기로 낮게 나타났다. 그리고 III-2는 chymotrypsin에서 높게 나타났으나 IV-2는 오히려 trypsin에서가 높았다. 이는 K_{m1} 값과 V_{max1} 값이 높은 곳에서 대부분 활성이 높게 나타나는 것과 일치하는 결과를 보였다.

하늘타리박의 경우 뿌리에서 분리한 trypsin inhibitor는 2% azocasein에 대한 억제가 trypsin에 대해서는 100% 억제 활성을 보이고 chymotrypsin에 대해서는 전혀 억제 활성을 나타내지 않았으나(Park *et al.*, 1994) 본 실험에서는 두 protease에 대해서 모두 억제 활성을 보이나 IV-2에서 가장 높게 나타났다. 한편, 대두에서 trypsin inhibitor들(8 종류)은 chymotrypsin 억제도에 대한 trypsin 억제도를 보았을 때 모두가 chymotrypsin에서 보다 trypsin에 대해서 높은 억제 활성을 보여 Bowman-Birk형으로 보고된 바가 있다(Choi and Kim, 1990). 그러나 해너콩에서는 전체적으로 볼 때 trypsin과 chymotrypsin에 대해 일방적으로 높은 억제 현상을 보이지는 않아 4 개의 trypsin inhibitor들은 각기 다른 억제 특성을 갖는 것으로 보여진다. 해너콩에서 분리된 IV-2를 보면 하늘타리와 비슷한 경우로 chymotrypsin보다 trypsin에서가 높은 억제를 보이고 있는데 azocasein을 기질로 한 결과를 비교하여 보면 IV-2의 경우는 대두에서와 같이 chymotrypsin에서 보다 trypsin에 대해서 높은 억제 활성을 보이고 있어 Bowman-Birk형으로 추정된다. 그러나 III-1과 III-2 그리고 IV-1은 chymotrypsin에서가 더 높은 결과를 보이고 있어서 Kunitz형에 가까울 것으로 보여진다.

각 trypsin inhibitor의 분자량과 K_{m1} , V_{max1} 값 그리고 기질 특성의 결과를 요약하면(Table 3), 분리한 trypsin inhibitor들은 분자량이 서로 다를 뿐 아니라, K_{m1} , V_{max1} 값도 서로 다르고 기질에 대한 친화도와 반응속도 면에서 각기 다른 억제 기작을 갖고 있는 것으로 판단되며, azocasein을 기질로 했을 때 III-1

과 III-2 그리고 IV-1은 trypsin보다 chymotrypsin에서 더 높거나 비슷한 억제 활성을 보이고 있어서 Kunitz형에 가까울 것으로 보여진다. 그러나 IV-2의 경우는 그 반대 현상을 보이고 있어서 대두와 같은 Bowman-Birk형으로 추정할 수 있

Table 3. Properties of purified trypsin inhibitors.

Property	Trypsin inhibitors				
	III-1	III-2	IV-1	IV-2	
Molecular weight	18.6 kD	ND	11.3 kD	15.1 kD	
Kinetic parameter*	K_{m_i}	2.31 mM	1.20 mM	0.53 mM	4.87 mM
	V_{max_i}	24.42 unit	19.84 unit	13.87 unit	32.74 unit
Inhibition type	noncompetitive	uncompetitive	uncompetitive	competitive	
Inhibitor type	Kunitz	Kunitz	Kunitz	Bowman-Birk	

* K_{m_i} and V_{max_i} represent the $K_{m_{app}}$ and the $V_{max_{app}}$ of trypsin in presence of purified trypsin inhibitors.

다. 그러나 trypsin inhibitor의 생리적 기능은 종자 내의 여러 가지 protease에 어떻게 작용하는지가 조사되어야 할 것이며 방어 작용에 대하여는 세균이나 곰팡이, 또는 곤충 등 다양한 분류군의 생물에 대한 bioassay를 거쳐 밝혀져야 할 것으로 생각된다. 또한, 이들 inhibitor의 활용 방안에 대하여는 분자 구조와 결합 부위의 sequence 등이 밝혀져야 할 것이다.

적 요

해너콩(*Canavalia lineata*) 종자에서 trypsin inhibitor들을 부분 정제하고 그 특성을 조사하였다.

산 침전법, 아세톤 침전법, Sephacryl S-100 겔 여과 크로마토그래피 그리고 DEAE-Sephacel 이온 교환 크로마토그래피에서 IV-1, IV-2, III-1, III-2순서로 4 개의 inhibitor 활성 분획이 각각 용출되었다. 분리된 각각의 inhibitor의 정제도는 84.5(III-1), 63.4(III-2), 14.1(IV-1), 276.1(IV-2)이었고, Sephacryl S-100 겔 여과 크로마토그래피를 통하여 얻은 각 trypsin inhibitor의 분자량은 18.6 kD(III-1)와 11.3 kD(IV-1) 그리고 15.1 kD(IV-2)이었다. 분리한 trypsin inhibitor의 K_{m1} 값은 inhibitor가 없을 때 2.35 mM, inhibitor를 첨가했을 때 각각 2.31 mM(III-1), 1.20 mM(III-2), 0.53 mM(IV-1), 4.87 mM(IV-2)이고 V_{max1} 값은 inhibitor가 없을 때 31.1 unit, inhibitor를 첨가했을 때 각각 244.2 unit(III-1), 198.4 unit(III-2), 138.7 unit(IV-1), 327.4 unit(IV-2)로 III-1 은 비경쟁적인 억제물, IV-1과 III-2는 반경쟁적 억제물, 그리고 IV-2는 경쟁적 억제 경향을 보였다.

Protease와 기질을 달리한 상태에서 inhibitor가 갖는 억제 활성은 전반적으로 III-1과 IV-2에서 높게 나타났고, azocasein을 기질로 하였을 때 III-1, IV-1의 경우 trypsin과 chymotrypsin 모두에서 비슷한 활성을 보였으며, III-2는 trypsin보다 chymotrypsin에서 높았으나 IV-2는 오히려 낮았다. 따라서 IV-2의 경우 Bowman-Birk형을 갖고 있었으며 나머지는 Kunitz형을 갖는 것으로 추정된다.

참고문헌

- Barrett, A. J. 1980. Introduction: The classification of proteinases. *Ciba Found. Symp.* 75:1~13.
- Baumgartner, B. and M. J. Chrispeels. 1976. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. *Plant Physiol.* 58:1~6.
- Bewley, J. D. and M. Black. 1978. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. In "Development, Germination, and Growth Vol. 1". Springer-Verlag, Berlin. pp.177~244.
- Chan, J. and B. O. Lumen. 1982. Biological effects of isolated trypsin inhibitor from winged bean(*Psophocarpus tetragonolobus*) on rats. *Korean J. Agric. Food Chem.* 30:46~50.
- Choi, K. B. and S. I. Kim. 1990. Bowman-Birk type protease inhibitors from soybean: Isolation and partial characterization. *Korean J. Agric. Chem.* 33:287~292.
- Fritz, H., V. Seemuller and H. Tscheche. 1984. Proteinase and their inhibitors. In "Methods of Enzymatic Analysis Vol. 5". General review. Verlag Chemie, Weinheim. pp.73~314.
- Karens, D., M. Susan and D. J. Bowle. 1983. Endopeptidase activity in jack bean and its effect on concanavalin A. *Planta.* 157:31~535.
- Kassell, B. 1976. Naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. In "Methods in enzymology Vol. 45" Academic Press, New York. pp.839~906.
- Koh, J. G. 1990. On the properties and proteolytic cleavage of concanavalin A in the cotyledons of *Canavalia lineata*. MS Thesis.

- Cheju National University, Cheju, Korea. pp.2~29.
- Koh, S. C., I. D. Hwang and Y. M. Kwon. 1993. Isolation and characterization of canavalin-hydrolyzing proteases in the cotyledons of *Canavalia lineata*. *Korean J. Biochem.* 26:485~491.
- Koh, S. C., I. O. Heo and Y. M. Kwon. 1994. Characterization of BAPNAase in cotyledons of *Canavalia lineata* seedlings. *J. Plant Biol.* 37(2):175~181
- Kwon, Y. M., H. C. Chung., S. C. Koh and Y. N. Hong. 1986. On utilization of canavanine and activity of canavanase during germination and growth of *Canavalia lineata*. *Korean J. Bot.* 29(2):85~94.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680~685.
- Laskowski, M. J. and I. A. Kato. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49:593~602.
- Laskowski, M. J., J. Kato and W. J. Kohn. 1978. Protein inhibitors of serine proteinases: convergent evolution, multiple domains and hypervariability of reactive sites. In "Versatility of proteins" Academic Press, New York. pp.307~318.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265~275.
- Nielsen, S. and I. E. Liener. 1984. Degradation of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. *Plant Physiol.* 74:494~498.
- Odani S. and T. Ikenaka. 1972. Studies on soybean trypsin inhibitors IV. Complete amino acid sequence and the antiproteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. *J. Biochem.* Tokyo. 71:839~848.

- Park, E. J., D. H. Yun., E. J. Cho., B. H. Ryu and H. S. Kim. 1994. Characterization of trypsin inhibitors purified from *Trichosanthes kirilowii* root. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26:81~87.
- Richard, H. 1981. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Anal. Biochem.* 123:143~146.
- Rosenthal, G. A. 1977. The Biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. *Quart. Rev. Biol.* 52:155~178.
- Rosenthal, G. A. and D. H. Janzen. 1983. Avoidance of nonprotein amino acid incorporation into protein by the seed predator, *Caryedes brasiliensis*. *J. Chem. Ecol.* 9:1353~1361.
- Ryan, C. A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:173~196.
- Ryan, C. A. 1981. Proteinase inhibitor In "The biochemistry of plants. Vol. 6" Academic Press, New York. pp.321~370.
- Shain, Y. and A. M. Mayer. 1968. Activation of enzymes during germination: trypsin-like enzyme in lettuce. *Phytochemistry* 7:1491~1498.
- Schleif, R. F. and P. C. Wensink, 1981. Practical methods in molecular biology. Springer-Verlag. New York. pp.74.
- Toshi, A., I. Fumio, T. Misao, I. Kimikazu and I. Fumio. 1991. Purification and characterization of a Bowman-Birk type proteinase inhibitor from faba beans (*Vicia faba* L.). *Agric. Biol. Chem.* 55(3):703~713.
- Umezawa, H. 1972. Enzyme inhibitors of microbial origin. University of Tokyo Press, Tokyo. pp.1~100.
- Wilson, A. L., P. M. Hartl, N. E. Delfel and K. A. Wilson. 1985. Differential expression of Kunitz and Bowman-Birk soybean proteinase

inhibitors in plant and callus tissue I. *Plant Physiol.* 78:310~314.
Yoon, J. W. and Y. M. Kwon. 1993. Partial purification and properties of
aminopeptidases in cotyledons of *Canavalia lineata*. *Mol. Cells* 3:83~
88.



감사의 글

본 논문이 완성되기까지 많은 지도와 격려를 아끼지 않으신 은사 고 석찬 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 부족하고 미흡한 논문을 바로잡아주신 허 인옥 교수님과 오 덕철 교수님께 감사드립니다.

오랜 시간 곁에서 좋은 충고와 조언을 주신 정균형, 넉넉한 마음으로 애써 준 영철, 심은 내색없이 끝까지 내 일처럼 도와 준 인석 그리고 언제나 웃음으로 반겨준 은옥에게 큰 고마움을 전합니다.

지금껏 많은 고마움을 느끼면서도 제대로 말씀 못 드린 생물학과 모든 교수님, 조언자가 되어준 대학원생 학우들 그리고 매사에 꼼꼼하게 챙겨주신 과사무실 송선생님께 깊은 감사를 드립니다.

저로 인하여 불편함을 느끼면서도 묵묵히 격려를 주신(주)웅진출판 지윤미부사장님, 칭찬과 자신감을 주셨던 박은미이사님, 넉넉함으로 힘이 되어 주셨던 장호원과장님 등의 사무실 식구와 사랑하는 제주지국 현 순희, 김민규, 유현이, 신지형, 홍정민과 그리고 선생님 모두에게 감사드립니다.

오늘이 있기까지 깊은 사랑으로 지켜봐 주시고 돌봐 주신 부모님, 형님, 형수님, 동생 태영, 따스한 마음으로 용기를 준 모든 친구들 그리고 마지막으로 이 작은 결실을 진심으로 기뻐 할 사랑하는 정석에게 이 논문을 바칩니다.

서른 둘의 겨울 말미에 서서...