

단백질공학에 의한 대두 GLYCININ의 고품질화에 관한 연구*

김 찬 식**

Studies on Improvement of Quality of Soybean Glycinin by Protein Engineering*

*Kim Chan-Shick***

Summary

Glycinin is one of the predominant storage protein of soybean, plays important in the functional properties of soybean proteins. To improve its functional properties(heat-induced gelation and emulsification) and/or nutritional value, the $A_{1a}B_{1b}$ proglycinin subunit was modified on the basis of genetically variable domains suggested from the comparison of amino acid sequences of glycinin type globulins from various legumes and nonlegumes and the relationships between the structure and the functional properties of glycinin. Thus, nucleotide sequences corresponding to each of the variable domains were deleted from the cDNA encoding the $A_{1a}B_{1b}$ proglycinin, and a synthetic DNA encoding four continuous methionines was inserted into the cDNA region corresponding to the variable domains.

Expression plasmids carrying the modified cDNAs were constructed and expressed in *Escherichia coli* strain JM105. The modified proteins were accumulated as soluble proteins in the cells at a high-level and self-assembled. This indicated that the *E. coli* expression system of glycinin cDNA may be used for the evaluation of the self-assembly and the food qualities of protein-engineered soybean proteins. The modified proteins were purified to homogeneity by salt precipitation, ion exchange chromatography, and cryoprecipitation. The functional properties(gelation and emulsification) of the modified proteins were compared with those of native glycinin. The modified protein($A_{1a}B_{1b}V+4Met$), exhibited functional superior to those of the native glycinin from soybean, which establishes the possibility of creating theoretically designed novel glycinins with high food qualities.

* 이 논문은 1992년도 한국과학재단 신진연구비 지원에 의해 연구되었음.

과제번호 923-1500-005-1

** 농과대학 농화학과(Dept. of Agricultural Chemistry, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

서 론

식물성 단백질은 동물성 단백질과 비교해서 경제적인 점에서는 우수하지만, 영양성, 기능 특성인 점에서는 열등하다. 그러나, 식물성 단백질에는 동물성 단백질에 부수되는 동물성 지질의 섭취 과다에 의한 성인병 유발(誘發)의 문제가 없다. 그러므로, 현재 세계적으로 직면하고 있는 포식(飢食)과 기아(飢餓)라고 하는 상반된 문제를 동시에 해결하기 위해서는 식물성 단백질의 영양 강화, 기능 특성 개선, 신기능 특성 부여(附與) 등에 의한 고품질화가 필요하다. 영양성, 기호성, 기능 특성을 개선하고 고품질인 대두 단백질을 얻는 방법으로서 유전 육종학적 개량, 그리고 유전자 조작에 기초를 둔 단백질 공학 등을 들 수가 있다(Kim, 1990).

단백질공학에 의해서 고품질화를 달성하기 위해서는, 우선 표적 단백질에 대한 유전자를 조제한 후, 그 구조와 기능특성 발현기구와의 상관관계등을 고려해서 고품질인 단백질을 분자설계하고, 그것에 대한 개량유전자(modified gene)를 조제하지 않으면 안 된다. 다음에, 개량유전자가 code하고 있는 단백질이 본래의 구조를 형성하고, 기대한 대로 기능특성을 나타낼 것 인가를 평가하는 것이 중요하다. 이 평가를 위해서는, 개량유전자의 대량발현체를 확립하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 신속한 관점에서 대장균에서의 대량발현체의 확립을 시도하였다.

대두단백질 중에서, 영양성, 기능특성이 우수한 glycinin에 대해서 연구를 수행하였다. Glycinin은 6개의 subunit로 구성되어 있다(Badley et al, 1975; Kitamura et al, 1976; Mori et al, 1979; Staswick et al, 1981; 1984). 각 subunit는 polysome 상에서, signal peptide, acidic chain, basic chain이 계속된 한가닥 사슬의 preproglycinin으로서 생합성된다. Cotranslational로 조면소포체(endolasmic reticulum, ER)로 이행할 때에, signal peptide가 processing을 받아서 proglycinin이 된다(Tumer et al, 1982). 이것은 ER중에 3량체(trimer)로 존재한다(Chrispeels 등, 1982; Barton et al, 1982). ER에서 protein body로 이행할 때에, 산성 사슬과 염

기성사슬 사이가 processing을 받아서 성숙형(mature form)이 되고, 6량체(hexamer)로서 protein body에 축적 저장된다(Tumer et al, 1982; Chrispeels et al, 1982; Barton et al, 1982). Glycinin의 구성 subunit로서, $A_{1a}B_{1b}$, $A_{1b}B_2$, A_2B_{1a} , A_3B_4 , $A_5A_6B_3$ 의 종류가 분류 동정되고 있다(Staswick, 1981; Fukazawa, 1985; Kim, 1990) 이러한 것은 아미노산 배열의 유사성으로 부터, A_1B_1 type ($A_{1a}B_{1b}$, $A_{1b}B_2$, A_2B_{1a})과 A_3B_4 type의 두 개의 group으로 분류된다. 이 group사이에는, 대두 단백질의 제한 아미노산인 methionin함량이 전자가 높은 특징을 가지고 있다.

대두 단백질을 단백질 공학적으로 개량(modified)시키는 방법으로서 domain 교환, 합성 DNA의 삽입(挿入), 특정 영역의 삭제(delete), 삽입 그리고 部位 특이적 변이(site-directed mutagenesis) 등이 있다.

Methionine 함량에 변이를 가진 cDNA 를 이용해서 acidic subunit $A_{1a}B_{1b}$ 와 basic subunit A_2B_{1a} subunit의 acidic subunit와 basic subunit을 교환함으로써 보다 영양성이 개선된 유전자를 조제(調製)하는 것이 가능하다. 이러한 domain 교환법의 경우, 대두 glycinin의 subunit로서 본래 존재하는 것이고, 또 아미노산 배열이 서로 유사한 것끼리 재조합함으로써 인하여 개량된(modified) 유전자가 code된 개량(modified)단백질의 구조 형성에는 문제가 없을 것이라고 생각된다. 그러나 기타 개량하는 방법의 경우에는 개량을 함으로 인하여 구조 형성에 손상을 받을 가능성이 있다.

그러므로 개량을 하고자 하는 부위(部位)의 선택이 중요한 과제가 된다. 개량을 하고자 하는 부위의 결정을 위해서는 X線 結晶解析 등에 의한 3차 구조의 座標가 필요하나, 대두 glycinin의 結晶化는 성공하지 못하고 있기 때문에 거기에 대한 知見이 없다. 그러나 최근 대두와 그밖의 종자 저장단백질인 11S globulin의 1차 구조가 밝혀지면서 그 비교로 부터 保存 영역과 개량 가능한 영역이 제시되고 있다(Argos, 1985; Wright, 1987, 1988). 보존영역은 구조 형성과 그 保持에 중요한 역할을 담당하고 있다고 생각되고 있다.

한편 개량 가능한 영역은 반대로, 구조 형성, 保

持에 그다지 중요한 역할을 하지 않은 영역 즉, 개량 가능부위로 생각되고 있다.

Acidic subunit의 N말단 부위 1부분과 acidic subunit 위의 3부분, 그리고 basic subunit의 C말단부위 1부분, 합계 5개 부분 영역이 개량 가능부위라고 추정되고 있다. 어느 개량 가능부위도 친수성 아미노산이 풍부하므로 folding 된 상태에서는 분자 표면에 노출될 것 이라고 생각된다(Kim, 1990).

어떠한 개량을 할 것인가에 대한 指針을 주는 것이 구조와 기능 특성과의 상관관계이다.

대두 glycinin의 가열 gel 化性과 구조적 특징과의 상관 관계의 해석 결과로 부터 가열 gel 化性 개량법으로서는 각 subunit의 glycinin 구조에서의 열 안정성의 저하 등의 있다. 또 기능 특성중의 하나인 유화성(乳化性)은 소수성(疏水性)과 친수성(親水性)의 균형(balance)에 기초를 둔 성질이므로, 소수성을 강화함으로써 유화성 개선이 가능하다고 생각할 수 있다.

또한, 영양성도 동시에 改善하기 위하여 methionine과 친수성 아미노산을 연속해서 code 한 합성 DNA를 대두 glycinin cDNA에 挿入함에 의해서 친수성 성질을 가진 개량 가능부위를 제거함으로써(상대적 소수성도를 상승시킴에 의해서 유화성, 보유성 등의 개선), 또 SH 기의 삭제 혹은 導入을 행함으로써 개량된(modified) 유전자를 조제할 수가 있다.

Hoffman, L. M. 등(1988)은 정상적인(normal) phaseoline 유전자와 개량된(modified) phaseoline 유전자를 transgenic plant에 도입하였을때 normal phaseoline은 protein bodies에 축적되었다. 그러나 modified phaseoline은 ER(endoplasmic reticulum)에서는 정상적인 phaseoline과 마찬가지로 trimers로 축적되었으나 protein bodies 에서는 모두 분해되어 검출하지 못했다고 보고하고 있다.

그러므로 이러한 modified gene을 식물에 도입하기 전에 미생물에서의 發現系를 이용하여 생산한 개량된 단백질(modified protein)의 分子集合能力(self-assembly)을 평가함으로써 개량된(modified) 유전자가 식물에 도입되었을때 완전한 식물체로 재분화 그리고 發現 蓄積을 어떻게 달성 하느냐를 예

상하는데 크게 공헌하리라 기대된다.

본 연구의 목적은 glycinin A_{1a}B_{1b} subunit의 수정 가능한 C말단 부위에 대두 단백질의 제한 아미노산인 methionine을 4개 연속해서 code 한 합성 DNA를 도입한 것을 대장균에서 대량 발현시켜 정제한 후에 native 인 glycinin과 modified glycinin의 기능 특성을 평가하여 高品質化 정도를 분석하는 것을 그 목적으로 한다.

재료 및 방법

1. 균주, 배지 및 plasmids

사용한 균주는 대장균(Escherichia coli strain) JM 105를 숙주(host cell)로 사용하였다.

배지는 1% bactotryptone(Difco), 0.5% yeast extract(Difco), 1% NaCl로 구성된 LB medium (pH 7.5)을 사용하였다.

여기에 사용한 plasmids는 pkk233-2 (Pharmacia), pKG A_{1a}B_{1b}-3을 사용하였다(Kim, 1990).

개량된 발현 Plasmids인 pKG A_{1a}B_{1b}V+4Met은 조제하여 사용하였다(그림 2).

2. 대장균에서의 개량단백질(modified proteins)의 발현과 검출

대장균에서의 modified 단백질의 대량 발현과 검출은 ampicilin 이 25μg/ml 가 포함된 LB 배지 500ml 에 각각의 expression plasmids가 들어있는 JM 105 overnight 배양액 5ml를 접종한 후 37°C에서 배양하였다. A₆₀₀=0.3에 도달했을 때 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종농도 1mM이 되도록 첨가해서 발현을 유도하였다. 다시 37°C에서 20시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 집균하였다. 균체를 sonicator로 파괴한 후, 원심분리하여 cell debris를 제거하고 그 상등액을 취하였다. 상등액은 SDS-sample buffer (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol 및 0.2M 2-mercaptoethanol)에 용해하여 가열한 후 SDS-PAGE를 사용하여 Laemmli 방법(1970)으로 분석하였다.

3. 대장균에서 발현된 modified 단백질의 정제

모든 정제단계는 4°C에서 수행하였다.

1) 단계1 : 추출과 원심분리

배양액 24L로 부터 대장균(strain/pKG A_{1a}B_{1b}V+4Met) 균체 80g(wet weight)을 50mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 240ml에 현탁시킨 후, lysozyme을 최종농도가 1mg/ml가 되도록 첨가하였다. 현탁액을 얼음속에서 30분동안 정치시킨 후, 대장균 균체를 초음파로 파쇄하였다. 대장균 균체 debris와 파괴되지 않는 균체(unbroken cells)는 원심분리(15,000rpm, 15min)에 의해 제거하였다. A_{1a}B_{1b}V+4Met 단백질은 그 상등액을 사용하여 다음 단계와 같이 정제를 실시하였다.

2) 단계2 : (NH₄)₂SO₄에 의한 분별(fractionation)

조추출액(crude extract)에 고체(NH₄)₂SO₄를 40% 포화되도록 첨가하였다. 이 용액을 30분 동안 교반시킨 후, 침전물은 원심분리(15,000rpm, 15min)에 의해 제거하였다. 그 상등액에 고체(NH₄)₂SO₄를 첨가하여 65%포화액이 되도록 조정한 후, 30분 동안 교반하였다. 침전된 단백질은 원심분리(15,000rpm, 15min)에 의해 모은 후, 35mM potassium phosphate 완충액(pH 7.6+0.15M NaCl, 10mM 2-mercaptoetanol, 0.02% NaN₃) (buffer B)에 현탁시켰다. 그 현탁액은 B 완충액 2L를 여러 번 새로운 완충액으로 교환하면서 24시간 동안 투석시켰다.

3) 단계3 : Q-Sepharose column chromatography

투석된 시료는 B완충액으로 평형된 Q-Sepharose column(1.7×24cm) (Pharmacia)에 주입하였다. 그 칼럼은 용출액이 흡광도(A₂₈₀)가 0.1이하가 될때까지 B완충액으로 세척한 후, B완충액에 NaCl이 0.15M NaCl에서 0.5M NaCl까지 직선상이 구배가 되도록 하면서 용출하였다. A_{1a}B_{1b}V+4Met 단백질이 포함된 fraction은 SDS-PAGE로 검출해서 얻었다.

4) 단계4 : Cryoprecipitation

A_{1a}B_{1b}V+4Met 단백질이 함유된 시료는 6mM Tris-HCl 완충액(pH 6.3, +10mM 2-mercaptoethanol, 0.02% NaN₃(bufer C)에 대해서 2일동안 여러번 완충액을 교환해주면서 투석시켰다. 투석된 시료는 원심분리(15,000rpm, 15min)에 의해 침전물을 얻었다. 침전물은 3.5mM potassium phosphate 완충액(pH 7.6+0.02% NaN₃) (buffer D)에 현탁시킨 후, 완충액 D에 대해서 1일 동안 투석시켜 정제 단백질을 얻었다. 이렇게 정제된 단백질은 환원조건에서 SDS-PAGE로 검출한 결과 homogeneous로 확인되었다.

4. 대두 native 단백질인 2S, 7S, 11S의 조제

대두의 2S, 7S, 11S fraction 조제는 Thanh와 Shibasaki(1976)방법에 따라 조제 하였다.

5. Protein determination

단백질은 bovine serum albumin 을 표준으로 해서 Bradford 방법(1976)에 따라 분석하였다.

6. 개량된(modified) 단백질의 기능 특성 평가

1) 단백질 gel의 측정

modified 정제 단백질과 대두 정제 glycinin은 3.5mM potassium phosphate 완충액(pH 7.6) (buffer A)에 gel을 조제하기 직전에 투석시켰다. 투석이 완료된 후, 각각의 단백질 용액들은 ultrafiltration에 의해 단백질 농도가 5-10% 농도가 되도록 농축 하였다. A완충액을 사용하여 4.5%단백질 농도로 희석시켰다. 단백질 gel은 Utsumi(1982)의 micro-method법에 따라 조제하였다. Gel hardness는 지름이 8mm인 plunger를 사용하여 rheometer를 사용하여 측정하였다. gel의 0.4 mm를 압축(compress)하는데 필요한 force를 hardness로 나타내어 비교하였다(Kim, 1990).

2) Emulsifying activity

modified 발현단백질에 대한 유화성(emulsifying activity)은 Pearce와 Kinsella(1978)방법에 따라 측정하였다. emulsion을 조제하기 위하여, 대두 oil

0.5ml와 단백질 0.05 %용액을 sonicator(100W, 30sec)로 처리하였다. 초음파 처리가 완료된 직후, 용기의 밑바닥으로 부터 emulsion 30ul를 취하여 0.1%(w/v)SDS 용액으로 처리하였다. 회석된 emulsion의 turbidity는 500nm의 wavelength에서 1cm pathlength cuvette를 사용하여 측정하였다. 각각의 emulsion에 대한 흡광도는 aliquot를 3개 취하여 측정 한 후, 그 평균값을 취하였다.

결과 및 고찰

1. 개량된 발현 plasmids 의 조제 (construction)

그림 1(A)는 Wright(1988)에 의해 제안된 $A_{1a}B_{1b}$ proglycinin의 가변 영역(variable domains)과 보존 영역(conserved domains)을 나타내 주고 있다.

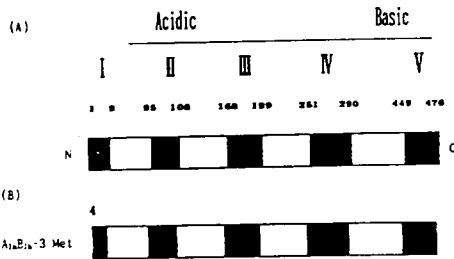


Fig. 1. (A) The variable and conserved domains of glycinin $A_{1a}B_{1b}$ subunit aligned by Wright(1988). The numbers of the residues from the N-terminus are described for the variable domains above the alignment. The five variable domains were labeled I-V. Shaded areas, variable domains; open areas, conserved domains. Acidic and Basic refer to the acidic and basic polypeptides respectively.
 (B) Construction of the $A_{1a}B_{1b}$ -3. $A_{1a}B_{1b}$ -3 lacks the N-terminal three amino acids. The N-terminal methionine was retained in $A_{1a}B_{1b}$ -3.

Glycinin의 기능 특성을 개선하기 위해, 그림 1(B)에 보여주는 것처럼 $A_{1a}B_{1b}$ proglycinin의 각각의 가변 영역(variable domains)의 삭제(delete)를 시도하였다. 여기에 조제(construction)된 각각의 expression plasmid의 번역 개시점(translation initiation site) 부근의 염기 배열은 $A_{1a}B_{1b}$ -3과 같다. 그러므로 발현된 단백질은 $A_{1a}B_{1b}$ proglycinin의 N 말단 3개 아미노산이 결핍(lack)되어 있고 번역 개시(initiation) methionine이 유지되고 있다. 영양성과 기능 특성을 동시에 개선하기 위해서, Wright(1988) 등에 의해 제안된 가변 영역(variable domains) V에 상당하는 cDNA 영역에 4개 연속된 methionine이 encoding 된 합성 DNAs를 삽입(insert)하여 그림2에 보여주는 것처럼 pKG $A_{1a}B_{1b}$ -3을 사용하여 pKG $A_{1a}B_{1b}V+4Met$ 을 조제(construction)하였다.

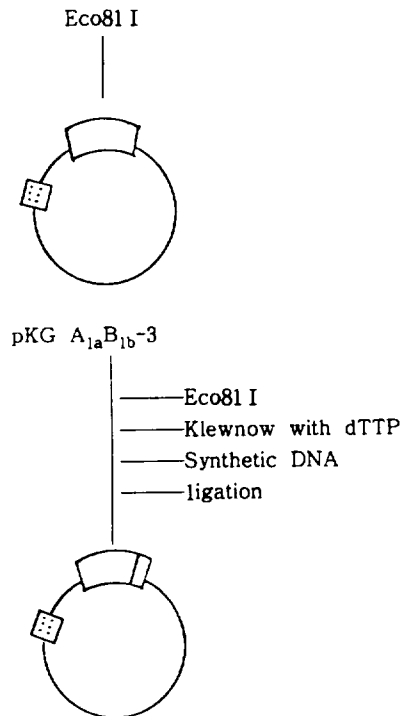


Fig. 2. Scheme for construction of expression plasmids pKG $A_{1a}B_{1b}V+4Met$. Synthetic DNAs used for pKG $A_{1a}B_{1b}V+4Met$ was 5'-CAGATGATGATGATGCA-3' 3'-CTACTACTACTACGTAG-5'.

삽입한 결과로 부터, Chou and Fasman 방법에 따라 예측된 번역 개시점 부근의 2차 구조는 random 으로부터 α -helix 구조로 변화되어 있었다.

pKG A_{1a}B_{1b}V+4Met 으로부터 발현된 개량(modified) 단백질은 Pro 467과 Glu 468 사이에 Glu-Met-Met-Met-Met-His 을 가지고 있었으며 2차 구조는 random 으로부터 α -helix 로 변환되어 있었다.

2. 대장균으로 부터 개량된(modified) 단백질의 발현과 검출

Ampicillin (25 μ g/ml) 이 들어있는 LB 배지 500ml 에 각각의 발현 plasmid 가 들어 있는 JM 105 overnight culture 5ml 를 접종하여 37C 에서 배양 하였다. A₆₀₀=0.3 에서 IPTG (isopropyl- β -D-thio-lactopyronoside) 를 최종 농도가 1mM 의 되도록 첨 가하였다. 37C 에서 20시간 배양한 후에 유도된 cells 은 원심분리에 의해 집균하였다.

발현된 각각의 시료(total cells) 들은 SDS-sample buffer (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, and 0.2% 2-mercaptoethanol) 에 녹 여서 SDS-PAGE 로 분석하였다.

A_{1a}B_{1b}V+4Met 은 대장균 균체내에서 대량(high le-vel) 으로 발현되었다.

3. 대장균으로 부터 modified 발현단백 질의 정제

각각의 modified 발현단백질의 정제는 대두 native glycinin 의 고유성질인 cryoprecipitation (저 온에서 냉각하면 침전하는 성질) 특성을 이용하여 상대적으로 보다 간편하면서 급속하게 대량으로 정 제할 수가 있었다. 발현단백질의 정제에 있어서 가장 중요한 특징은 대장균 균체 세포추출물(cell extract) 의 가용성부분에 발현단백질이 대부분 존재하고 있었기 때문에, 각각의 발현단백질의 어떤 정제 단계에서도 발현단백질의 recovery 를 위해 강한 변성제(denaturants) 를 사용하지 않아도 된다는 점이다. 그림 3은 A_{1a}B_{1b}V+4Met 발현단백질의 포함된 fraction 위치를 SDS-PAGE 분석에 의해 Coomassie Blue 염색에 의해 확인한 결과와 B완충액의 NaCl gradient 에 대한 대장균 단백질의 용출

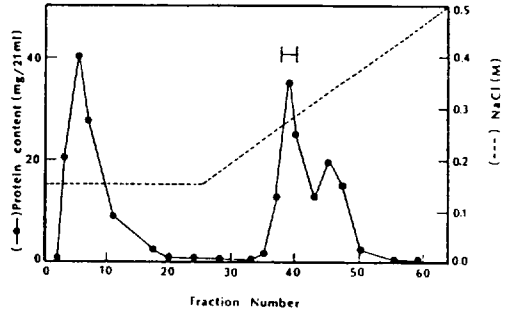


Fig. 3. Purification of A_{1a}B_{1b}V+4Met by a Q-Sepharose Column Chromatography. The protein content of each fraction was measured by the method of Bradford(1976), and sample of selected fractions were analyzed by SDS-PAGE on 11% gels. The bar indicates the column fraction that were pooled.

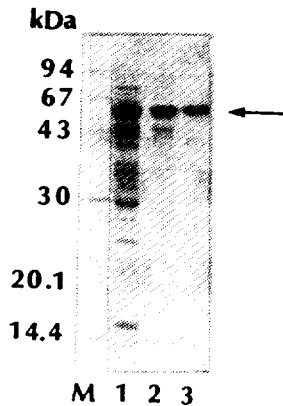


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of A_{1a}B_{1b}V+4Met samples at different stages of purification. Lane M, molecular weight markers; Lane 1, fraction with 40-65% saturation of ammonium sulfate; Lane 2, Q-Sepharose pool; Lane 3, cryoprecipitate. The arrow indicates the position of A_{1a}B_{1b}V+4Met. The numbers on the left denote molecular weight of markers.

pattern 을 보여주고 있다. 이 단계에서 정제하여 얻어진 fraction 들은 모은 후에, cryoprecipitation 정제 단계를 거쳐 최종적으로 정제된 발현단백질을

었다. 그림 4는 정제하는 과정에서 $A_{1a}B_{1b}V+4Met$ 이 포함된 fraction의 SDS-PAGE분석 결과를 보여주고 있다. 최종적으로 정제된 단백질의 예상되는 분자량은 약 55 kDa정도로 판명되었다(그림 4, lane 3).

4. 개량 단백질(modified proteins)의 분자집합능력(self-assembly)

정제된 $A_{1a}B_{1b}V+4Met$ 발현단백질의 분자집합능력(self-assembly)은 sucrose density gradient centrifugation에 의해 분석한 결과, 대두의 ER(endoplasmic reticulum)에서 관찰되는 것과 마찬가지로의 3량체(trimer)로 관찰되었다(그림 5).

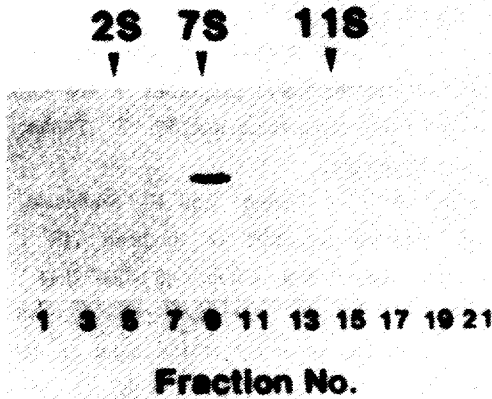


Fig. 5. Self-assembly of the modified proteins. Assembly was assayed by sucrose density gradient centrifugation and the proteins in each fraction were detected by immunoblotting. The 2S, 7S and 11S fractions purified from soybeans according to Thanh and Shibasaki(1976) were run in parallel as size markers.

5. 개량 단백질의 기능특성 평가

개량 단백질들의 기능특성(겔화성과 유화성)을 대두 native glycinin과 비교 검토하였다. 대두 native glycinin의 유화성(emulsifying activity)을 100%라고 했을때, 개량 단백질 $A_{1a}B_{1b}V+4Met$ 은 210%정도를 나타내어 대두 glycinin보다 유화성이 약 2배정도 높게 나타난 결과를 보여주고 있다. 이

러한 결과는 C-terminal의 소수성(hydrophobicity)이 glycinin의 유화성과 밀접한 관계를 가지고 있다는 것을 시사해 주고 있다.

개량 단백질들의 겔화성(hardness)을 대두 native glycinin과 비교 하였다. 단백질 농도 4.5%gel을 조제하고 대두 glycinin과 각각의 modified 단백질 gel의 hardness를 측정 한 결과, 대두 glycinin gel의 hardness는 1.2(g.f)을 나타내었으나, $A_{1a}B_{1b}V+4Met$ 단백질 gel은 2.3(g.f)을 나타내어 native glycinin에 비해 gel강도가 높게 나타나는 결과를 보여주고 있으며 이러한 것은 우수한 기능 특성을 가진 대두 단백질을 창제할수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

적 요

글리시닌은 대두의 주요 저장단백질중의 하나로써 대두단백질의 기능성에 중요한 역할을 하고 있다. 대두 단백질의 기능성(가열에 의한 겔화성 또는 유화성), 영양가 등을 향상시키기 위해서 $A_{1a}B_{1b}$ proglycinin subunit를 글리시닌의 구조와 기능과의 관계 그리고 여러종류의 콩과 및 비콩과 식물의 글리시닌 형태의 글로불린 아미노산배열을 비교함으로써 제안된, 유전적으로 variable domain에 기초를 두고 개량(modification)하였다. 각 variable domain에 상당하는 핵산 염기배열을 / $A_{1a}B_{1b}$ prog-glycinin이 code하고 있는 cDNA를 삭제(deletion)하거나, 각 variable domain에 상당하는 cDNA영역에 4개 연속된 methionine을 code하고 있는 합성 DNA를 삽입하였다. 개량된 cDNAs의 발현 pla-smid를 조제하고 대장균 JM105균주를 사용하여 발현시켰다. 개량된 단백질은 대장균 균체내에 대량으로 용해성 단백질 형태로 축적되었으며, 분자집합능력을 가지고 있다. 이것은 글리시닌 cDNA의 대장균 발현 시스템이 단백질공학적으로 설계한 대두단백질의 식품품질과 분자집합능력을 평가하는데 사용할수 있다는 것을 시사하고 있다. 개량된 단백질은 유안암모늄 침전, 이온교환크로마토그래피, 그리고 저온에서 침전하는 성질을 이용하여 정제하였다. 개량된 단백질의 기능특성을 native인 대두 글리시닌과 비교하였다. 개량 단백

질(A_{1a}B_{1b}V+4Met)은 대두 글리시닌보다 기능특성이 우수한 것으로 나타났으며 이러한 것은 이론적

으로 우수한 기능특성을 가진 대두 단백질을 창제할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

참 고 문 헌

- Argos, p., S. V. L. Narayanas, and N. C. Nielsen. 1985. : Structural similarity between legumin and vicillin storage proteins from legumes. *EMBO J.* 4 : 1111-1117.
- Badley, R. A., D. Atkinson, H. Hauser, D. Oldani, J. P. Green, and J. M. Stubbs. 1975. : The Structure, Physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. *Biochim. Biophys. Acta* 412 : 214-228.
- Barton, K. A., J. F. Thompson, J. T. Madison, R. Rosenthal, N. P. Jarvis, and R. M. Beach. 1982. : The biosynthesis and processing of high molecular weight precursors of soybean glycinin subunits. *J. Biol. Chem.* 257 : 6089-6095.
- Bradford, M. M. 1976. : 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.
- Chrispeels, M. J., T. J. V. Higgins, and D. Spencer. 1982. : Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons. *J. Cell Biol.* 93 : 306-313.
- Dickinson, C. D., L. A. Floener, G. G. Lilley, and N. C. Nielsen. 1987. : Selfassembly of proglycinin and hybrid proglycinin synthesized in vitro from cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 5525-5529.
- Dickinson, C. D., E. H. Hussein, and N. C. Nielsen. 1989. : Role of posttranslational cleavage in glycinin assembly. *The Plant Cell* 1 : 459-469.
- Fukazawa, C., k. Udaka, A. Murayama, W. Higuchi, and A. Totsuka. 1987. : Expression of soybean glycinin subunit precursor cDNAs in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 224 : 125-127.
- Hoffman, L. M., D. D. Donaldson, and E. M. Herman. 1988. : A modified storage protein is synthesized, processed, and degraded in the seeds of transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 11 : 717-729.
- Kim, C. S. 1990 : Studies on high-level expression and functional properties of soybean glycinin from microorganisms. Ph. D. Thesis, Kyoto University.
- Kitamura, K., T. Takagi, and K. Shibasaki. 1976. : Subunit structure of soybean 11S globulin. *Agric. Biol. Chem.* 40 : 1837-1844.
- Laemmli, U. K. 1970. : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Matsudaria, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262 : 10035-10038.
- Miles, M. J., V. J. Morris, D. J. Wright, and J. R. Bacon. 1985. : A study of the quaternary structure of glycinin. *Biochim. Biophys. Acta* 827 : 119-126.
- Mori, T., S. Utsumi, and H. Inaba. 1979. : Interaction involving disulfide bridges subunits of soybean seed globulin and between subunits of soybean and sesame seed globulins. *Agric. Biol. Chem.* 43 : 2317-2322.
- Mori, T., S. Utsumi, H. Inaba, K. Kitamura, and K. Harada. 1981. : Differences in subunit composition of glycinin among soybean cult-

- ivars. *J. Agric. Food Chem.* 29 : 20-23.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. : DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463-5467.
- Staswick, P. E., M. A. Hermodson, and N. C. Nielsen. 1981. : Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *J. Biol. Chem.* 259.
- Staswick, P. E., M. A. Hermodson, and N. C. Nielsen. 1984. : Identification of the cystines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits. *J. Biol. Chem.* 259 : 13431-13435.
- Thanh, V. H. and K. Shibasaki. 1976. : Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem.* 24 : 1117-1121.
- Tumer, N. E., J. D. Richter, and N. C. Nielsen. 1982. : Structural characterization of the glycinin precursors. *J. Biol. Chem.* 257 : 4016-4018.
- Tumer, N. E., V. H. Thanh, and N. C. Nielsen. 1981. : Purification and characterization of mRNA from soybean seeds. Identification of glycinin and conglycinin precursors. *J. Biol. Chem.* 256 : 8756-8760.
- Utsumi, S., H. Inaba, and T. Mori. 1981. : Heterogeneity of soybean glycinin. *Phytochemistry* 20 : 585-589.
- Utsumi, S., C.-S. Kim, M. Kohno, and M. Kito. 1987. : An alternate cDNA encoding glycinin subunits. *Agric. Biol. Chem.* 51 : 3267-3273.
- Utsumi, S., C. -S. Kim, T. Sato, and M. Kito. 1988 : Signal sequence of preproglycinin affects production of the expressed protein in *Escherichia coli*. *Gene* 71 : 349-358.
- Utsumi, S., T. Sato, C. -S. Kim, and M. Kito. 1988. : Processing of preproglycinin expressed from cDNA-encoding $A_{1a}B_{1b}$ subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 233 : 273-276.
- Wright, D. J. 1987. : IN Hudson, B. J. F. (ed), *Developments in Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London, Vol. 5 : 81-157.
- Wright, D. J. 1988. : IN Hudson, B. J. F. (ed), *Developments in Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London, Vol. 6 : 119-177.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieria, and J. Messing. 1985. : Improved M13 Phage cloning vectors and host strains. *Gene* 33 : 103-119.