

효모단백질내의 셀레늄 분포 및 특정단백질내의 셀레노메티오닌 분석

심희영 · 안상욱 · 안용현*
단국대학교 자연과학대학 화학과
(2003. 5. 17 접수)

The Distribution of Selenium in Proteins of *Saccharomyces Cerevisia* and Analysis of Selenomethionine in Specific Protein

Heeyoung Shim, Sangwook Ahn, and Yonghyun Ahn*
Department of Chemistry, Dankook University, Seoul 140-714, Korea
(Received May 17, 2003)

요 약. 효모를 최적 배양조건에서 키운 후 1.14×10^{-3} M의 셀레늄을 배양액에 가하여 24시간 배양한 후 효모를 얻는다. 효모의 건조중량에 대하여 약 0.1% (w/w) 이상의 셀레늄을 함유하는 고농도의 셀레늄-효모를 얻었고 세포벽에 부착된 무기셀레늄은 세척 후 MBRT과정으로 확인하였다. MBRT에서 15분 이상 푸른색이 지속되는 결과로 무기이온의 세포벽 흡착이 거의 없음을 확인하였다. 셀레늄이 함유된 효모를 초음파로 분해한 후 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액을 이용하여 단백질을 부분 정제하였고 ICP-AES로 측정된 효모내의 셀레늄 농도와 비교하였을 때 약 60.6%의 셀레늄이 단백질 내에 존재함을 확인하였다. 전기이동으로 단백질을 분리하여 확인한 결과 많은 양이 발현된 단백질 띠에서는 상대적으로 셀레늄의 농도가 높았다. 그중 47 kDa 단백질의 경우 69.5 $\mu\text{g Se/g}$ 의 농도로 가장 많은 함량을 보였다. 이 단백질을 PVDF 막에 electroblotting하여 분리하였고 이를 산으로 가수분해하여 얻어진 아미노산들을 PITC와 반응시켜 유도체를 얻었다. 아미노산유도체들을 HPLC로 분리 확인한 결과 셀레노메티오닌의 상대적 비율이 총아미노산의 2%로 얻어졌다. 이러한 셀레늄은 단백질과 킬레이트의 형태로 존재하는 것이 아니고 대부분이 셀레늄의 유기체인 셀레노메티오닌으로 효모 내에서 생합성 된다고 볼 수 있다.

주제어: 셀레늄, 효모, 셀레노아미노산, 셀레노메티오닌

ABSTRACT. Selenized yeast (Se yeast) containing 0.1% (w/w) of selenium was obtained when the yeast was incubated at a selenium concentration of 1.14×10^{-3} M in rich medium. After washing several times, the inorganic selenium on the cell wall was confirmed with MBRT. There was no indication of inorganic selenium on the cell wall when the blue color in MBRT was stayed for 15 minutes. The selenized yeast was sonicated, then the selenium contained protein was obtained after salting out by ammonium sulfate at the concentration 80% saturation. The seven protein bands were separated by SDS-PAGE and the selenium concentration in protein was measured by ICP-AES. Analytical data showed that the large expressed protein band contained a relatively large amount of selenium. The proteins of the 47kDa was contained the concentrations of 69.5 $\mu\text{g Se/g}$ of most many content. The protein (47 kDa) was separated from PVDF membrane by tank-electroblotting. The isolated protein was hydrolyzed under acid condition and reacted with PITC. The derivatives of amino acids were analyzed by HPLC and compared with the data obtained from regular yeast. The resulting selenium-yeast was analyzed with the selenomethionine concentration of 2% compared with general amino acids. The goal of this study is to analyze the selenium concentration in protein bands and measure the degree of biotransformation of selenomethionine in a specific protein.

Keywords: Selenium, *Saccharomyces cerevisiae*, Selenoamino Acids, Selenomethionine

서 론

최근 생체의 생리활성을 자극하여 건강을 유지하도록 하는 미네랄의 중요성은 오래 전부터 인식되어져 왔고, 오늘날 17가지 이상의 미네랄 원소(Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Se, Cr, Cu)들이 생명 시스템에 필수적인 것으로 알려져 왔다. 그 중 셀레늄은 항 계통의 비금속 무기물질이며 지구상에는 극미량이 존재하는 미량원소로서 천연물에서의 셀레늄은 맥주효모(20 µg/g), 보리(0.64 µg/g), 조(0.64 µg/g), 소맥분(0.62 µg/g), 새우(0.57 µg/g), 우유(0.48 µg/g), 현미(0.3 µg/g) 그리고 마늘(0.25 µg/g)등에 미량 함유되어 있다.¹

셀레늄은 1957년 K. Schwarz와 Foltz에 의하여 비타민 E를 결핍시킨 쥐에서 관찰되는 간경병에 극미량의 셀레늄의 투여로 예방될 수 있음이 알려지면서 처음으로 영양소로서의 기능²이 알려지기 시작하였다. 그 후 Rotruck 등에 의하여 셀레늄이 적혈구의 글루타티온 페록시다아제(GPx)의 구성성분³으로 가축과 사람에게 필수영양소로 인정되게 되었다. 셀레늄 의존효소인 GPx를 활성화시켜 체내 대사과정에서 활성산소(ROS)의 작용을 억제 또는 제거함으로써 산화방지 효과를 나타내는 항산화기능(antioxidant function)을 하면서 이러한 과정에서 비타민 E와 결합한 셀레늄은 면역항체의 생성을 촉진시킴으로서 중앙성 질환을 예방하는 작용⁴을 가진 것으로 알려져 있다.

현재까지는 10여 가지의 생리적 활성형 셀레늄 함유 단백질(Se-containing proteins)이 동물조직에서 분리 동정되어 졌다.⁵⁻⁹ 셀레늄은 체내에서는 주로 셀레노시스테인과 셀레노메티오닌 등의 셀레노아미노산 형태로 존재하며 체내 셀레늄의 함량은 요를 통한 배설로 조절된다. 식물은 황 대신에 토양으로부터 흡수한 셀레늄을 이용하여 셀레노메티오닌을 생합성한 후 단백질에 저장하며 동물의 경우 메티오닌을 생합성 할 수 없으므로 식물성 천연물의 섭취를 통하여 체내로 유입된 셀레노메티오닌을 간에서 셀레노시스테인으로 전환시켜 셀레늄단백질의 생합성에 이용하며 남아있는 셀레늄은 트리메틸 셀레늄으로 전환되어 체외로 배설된다.¹⁰

효모는 인체에 무해하며 50%이상이 양질의 단백질과 다량의 미네랄, 비타민 B군 등이 함유되어 있어 여러 유용물질인 단백질, 핵산, 효소, 지질, 비타민, 미네랄 등의 원료로 사용되어 왔다. 그리고 다른 미생물과 달리 성장배지의 환경에 따라 혐기적 또는 호기적으로

반응하고 외부의 영향에 민감하게 대응하는 기능을 가지고 있기 때문에 셀레늄 연구에 많이 이용된다.¹¹⁻¹³ 효모에 의한 금속성분의 축적은 세포의 대사와 무관한 세포벽에 의한 표면흡착과 대사과정과 밀접하게 연관된 세포내로의 금속의 유입의 두가지 경우에 의하여 이루어진다. 세포벽에는 리간드로서 인산기, 카르보닐기, 아민기, 키틴, 키토산 등이 금속의 흡착에 관여하며, 셀레늄의 세포내로의 유입기작은 표면흡착보다 속도가 느리지만 더 많은 양의 셀레늄을 축적할 수 있으며, 이 현상은 낮은 온도, 포도당 유사물질, 대사 저해제 등에 의하여 저해를 받는다. 미생물 배양에서 셀레늄의 흡착과 유입은 배지조성의 변화와 금속 킬레이터로서 작용할 수 있는 대사물질의 분비에 의해 영향을 받을 수 있다.¹⁴

본 연구에서는 효모단백질의 분자량에 따른 셀레늄의 분포 및 한 분자량의 단백질을 선택하여 셀레노메티오닌으로 변환되는 양을 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 셀레늄-효모

본 실험에서는 *Saccharomyces cerevisiae* VH-2(JENICO Co.) 균주를 분양 받아 사용하였다. 이 종균에 대한 전 배양은 YM 배지(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, dextrose 1%(w/v)를 사용하였고, 대량생산을 위하여 production 배지(Molasses 17.64%, CO(NH₂)₂ 0.616%, H₃PO₄ 0.416%, (NH₄)₂SO₄ 0.194%, KCl 0.0554%, MgSO₄ 0.0428%, CaSO₄ 0.0286%, ZnSO₄ 0.001592%, thiamine 0.000214%(w/v)을 사용하였다. 배양조건은 본 배양배지를 기준으로 0.8-1.14%(w/v)의 전배양균을 사용하여 30 °C, 200 rpm에서 본 배양하였다. 셀레늄의 공급원은 Na₂SeO₃(Sigma co.)을 사용하였다. 본 배양액의 대수기에서 Na₂SeO₃를 약 2~3회에 나누어 총 1.14×10⁻³ M이 되도록 주입하였고 48시간 동안 배양한 후 효모를 3,000×g, 10분간 원심분리 하였다. 회수된 셀레늄-효모는 0.1 M 인산나트륨 완충용액과 3차 증류수로 5회간 반복 세척하여 효모막에 부착되어 있는 무기셀레늄을 제거하였다.

셀레늄 농도 측정

상기에서 얻어진 세포침전물은 셀레늄-효모내의 셀레늄 농도 측정에 사용하였다. 유기물 성분이 셀레늄의 원자화를 저해하는 것을 방지하기 위하여 세포침전물

의 건조중량 0.1 g을 HNO₃ 30%, H₂O₂ 20%, 3차증류수 50%의 혼합용액(10 mL)을 첨가하여 98 °C에서 10 시간 동안 산분해법으로 유기물을 분해¹⁵하였다. 동일한 과정을 2회 반복하여 유기물을 분해한 후 HCl을 첨가하여 잔류물을 용해시킨 후 이 시료를 ICP-AES에 도입하여 셀레늄 농도를 측정하였다. 효모막에 부착되어 있는 무기셀레늄의 농도는 MBRT법을 이용하였다. 건조된 효모 0.1 g을 7 ml의 환원용액[0.2 N 인산완충용액(pH 5.5)에 1-thioglycerol를 20%(w/v) 혼합한 용액]에 넣고 밀봉상태에서 3분간 200 rpm으로 혼합한 후 지시약인 메틸렌 블루 용액(2%) 한 방울을 떨어뜨린 후 푸른색이 사라지는 시간을 측정함으로써 효모막에 붙어 있는 무기셀레늄의 농도를 측정하였다.

단백질의 정제

상기에서 얻어진 효모(15 g/g wet)를 15 mL의 완충용액에(0.1 M Tris-HCl, pH 8.0)에 혼탁 시킨 후 초음파 분쇄기(Sonicator 250, Branson)를 이용하여 70%의 power에서 10분간 세포막을 분쇄하였다. 혼합용액을 10,000 × g에서 15분간 원심분리 하였다. 셀레늄을 함유한 단백질(crude cell-free extract)을 대량으로 정제하는 방법으로 4.1 M(NH₄)₂SO₄를 이용하여 용액의 포화도가 80% 이상 되도록 염석 처리하였다. 염석 처리 후 투석막(Spectra/por4, Spectrum Co.)을 사용하여 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)에서 저온 교반을 시행하여 20시간 동안 염을 제거하였다. 상기 추출물을 냉동 건조한 후 -20 °C에서 보관하여 사용하도록 하였다.

셀레늄을 포함한 단백질(crude cell-free extract)을 10% SDS-PAGE로서 일차원 전기이동으로 전개하였다. 분리된 단백질은 PVDF(polyvinylidene difluoride)막에 100 mA

의 전류로 2시간 동안 electroblotting하였다.¹⁶ 염색은 Coomassie Brilliant Blue(CBB), R-250를 사용하였고 탈색 후 PVDF막을 건조하여 목적 단백질을 얻어내었다.

아미노산 분석

상기의 PVDF막에 옮겨진 단백질 중 47 kDa의 펩타이드를 분리한 후 6 N HCl으로 가수 분해 하여 아미노산들을 얻었다. 완전히 건조시킨 아미노산들을 phenylisothiocyanate(PITC)와 반응시켜 유도체화 시킨 후 HPLC(Pharmacia Co.)로 pmol의 아미노산을 분석하였다(Table 1). 기존 아미노산들은 표준물질의 retention time과 area를 이용하였고 셀레노아미노산 분석을 위한 표준물질은 셀레노-D, L-메티오닌[C₅H₁₁NO₂Se; M.W 196.1](Sigma Co.)와 PITC를 반응 시켜서 얻어진 유도체를 이용하였다.¹⁷⁻²¹ 분석을 위한 시료준비는 셀레늄을 주입하지 않은 배양효모에서 정제된 47 kDa의 펩타이드를 대조군(A)으로 하였고, 상기에서 준비된 셀레늄-효모에서 정제된 47 kDa의 펩타이드는 시험군(B)으로 하였다.

결과 및 고찰

셀레늄-효모

효모가 무기셀레늄의 독성에 영향을 받지 않고 정상적인 성장활동을 할 수 있는 대수성장기까지 증식시킨 후 1.14 × 10⁻³ M의 셀레늄을 4회 나누어 효모배양액에 주입하였다. 셀레늄의 생체이용성과 체내에서의 대사 및 독성에 대한 영향을 고려한 결과이다. 1.14 × 10⁻³ M의 셀레늄을 주입하여 얻은 효모내의 셀레늄의 농도를 ICP-AES로 분석한 결과 g 건조중량에 대하여 600~1,000 µg

Table 1. The conditions of HPLC PICO-TAG system (Hewlett Parkard 1100 series)

HPLC PICO-TAG system	
Column	Phenomenex luna C-18 column (4.6×250 mm, 5 µm)
Colum oven tempt.	46 °C
HPLC pump	HP 1100 series, Binary Pump
HPLC injector	HP 1100 series, Autosampler
Variable wavelength detector	HP 1100 series, 254 nm
Solvent	A) 1.4 mM CH ₃ COONa, 0.1% TEA, 6% CH ₃ CN, pH 6.1, B) 60% CH ₃ CN
Elution	Linear gradient of solvent B (0-100%)
Flow rate	1.0 ml/min
Run time	40 min
Equil. time	10 min
Injection vol.	Standard : 4 µl, Sample : 4 µl

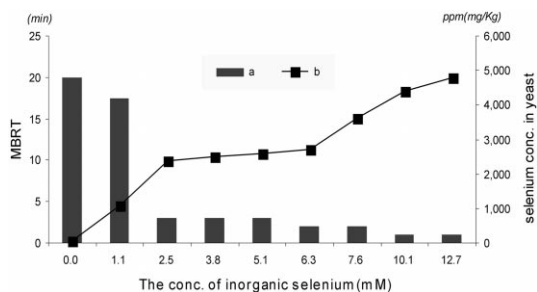


Fig. 1. (a) The MBRT of the selenium-yeast against a addition concentrations of inorganic selenium, (b) The concentration of selenium in the selenium-yeast against a addition concentrations of inorganic selenium^a. (^aanalysis by ICP-AES).

Se/g yeast 이상의 셀레늄을 함유하였다. Na_2SeO_3 첨가량에 따른 셀레늄-효모의 생산량은 셀레늄의 농도가 일정량 증가함에 따라 효모의 생산량도 증가하지만 과도한 양의 Na_2SeO_3 이 투여 되었을 경우 효모의 생산량이 감소한다. 효모의 생산량이 감소되지만 상대적인 셀레늄의 농도는 많이 증가하지만 이러한 결과는 유기셀레늄의 형태로 존재하는 것이 아니라 무기형태로 세포벽에 부착되어 있는 경우가 대부분이다. 셀레늄-효모막에 흡착된 무기셀레늄 농도를 확인하는 과정으로 셀레늄-효모의 MBRT법에 의한 푸른색의 경과시간을 확인하였다(Fig. 1). MBRT에서 $1.14 \times 10^{-3} \text{ M}$ 이상의 셀레늄을 주입하여 얻어진 셀레늄-효모의 경우 5분 이내에 지시약의 푸른색이 사라졌으며 이는 셀레늄이 효모세포벽에 흡착되어 무기셀레늄 형태로 존재하고 있음을 나타낸다. 또한 $1.14 \times 10^{-3} \text{ M}$ 이내의 셀레늄을 주입하여 얻어진 셀레늄-효모의 경우 15분 이상 지시약의 푸른색이 지속되는 결과로 무기셀레늄이 세포벽에 흡착되어 있는 것이 아니라 셀레늄이 효모세포내로 유입되어 유기셀레늄 형태로 전환됨을 예측할 수 있었다. 즉, 상대적으로 유기셀레늄의 농도를 가늠함으로써 점차적으로 셀레늄 주입농도가 높아짐에 따라 유기셀레늄으로의 전환되는 최적의 농도를 얻게 되고 이러한 발효조건을 응용하여 유기 셀레늄이 최대 농도로 함유된 효모를 얻을 수 있다.

셀레늄단백질의 정제

$1.14 \times 10^{-3} \text{ M}$ 의 Na_2SeO_3 을 주입하여 얻은 효모의 셀레늄 농도를 ICP-AES로 측정한 결과 $1,074 \mu\text{g Se/g yeast}(\text{ppm})$ 로 얻어졌다. 이 효모는 초음파 분쇄기를 이

용하여 파쇄 하였고 효모의 건조중량에 대하여 약 16.7% (w/w)의 셀레늄 함유 단백질(crude cell-free extract)이 추출되었다. 이 추출물은 80%의 $4.1 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액을 이용하여 염석 · 투석하여 부분 정제된 단백질을 얻었다. 염석에서 얻어진 단백질의 셀레늄 함량을 ICP-AES로 측정한 결과 $651 \mu\text{g Se/g protein}(\text{ppm})$ 으로 얻어졌다. 이 결과를 효모내의 셀레늄 농도와 비교하였을 때 약 60.6%의 셀레늄이 단백질 내에 존재함을 확인하였다.

정제된 단백질에 셀레늄이 함유되는 정도를 단백질의 분자량별로 분석하였다. 전기이동으로 단백질을 7개의 띠로 분리한 후 각각 분리된 단백질에서 셀레늄 농도를 측정하였다(Fig. 2). 분리된 단백질 띠의 셀레늄 농도를 측정한 결과 55 kDa, 47 kDa, 32 kDa의 단백질은 분리된 다른 분자량의 단백질보다 2배 이상의 셀레늄이 포함되어 있는 것으로 나타났다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 55 kDa, 47 kDa, 32 kDa의 단백질의 양이 상대적으로 많이 발현되었기 때문인 것으로 생각된다(Fig. 3). 특히 47 kDa 단백질(crude proteins)의 경우(시료 2)

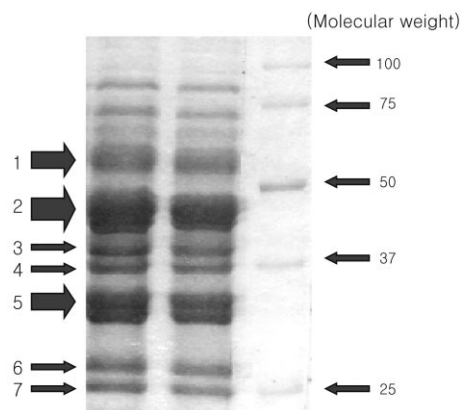


Fig. 2. Selenoprotein bands separated by SDS-PAGE electrophoresis.

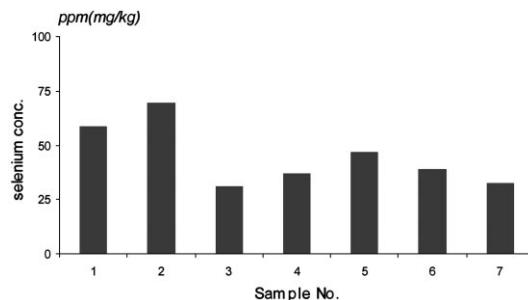


Fig. 3. The selenium concentration in protein bands.

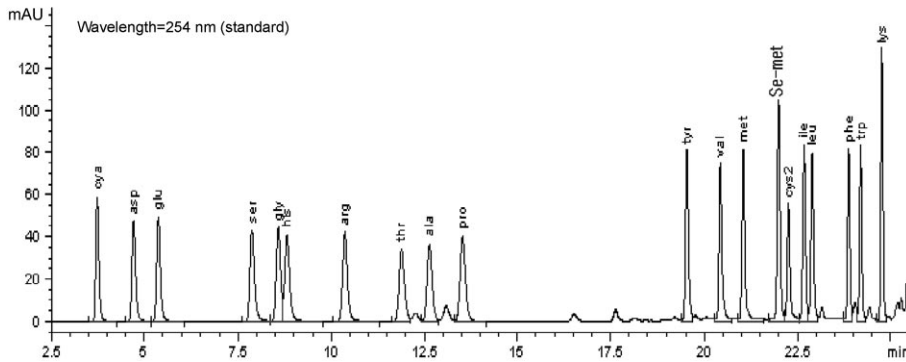


Fig. 4. HPLC chromatogram of standard amino acids.

69.5 $\mu\text{g Se/g}$ 의 농도로 가장 많은 함량을 보였다. 이러한 단백질의 발현은 셀레늄의 영향이 아니고 본 실험에서 사용한 균주의 특성으로 생각한다.

47 kDa 단백질의 셀레노아미노산 분석

다음으로 단백질의 부분정제법으로 이용한 PVDF 막에 electroblotting하는 과정은 위 셀레늄 함유 단백질의 미량 검출을 쉽게 하였고 electroblotting에 의해 추출된

미량 단백질로부터 아미노산을 분석하기 위한 시료를 쉽게 얻을 수 있었다. Electroblotting 방법으로 추출된 단백질 중 가장 많은 셀레늄을 함유하는 47 kDa의 분자량을 가진 펩타이드(시료 2)를 분리하여 산으로 가수분해 한 후 얻어진 아미노산들을 PITC와 반응시켜 유도체화 시킨 후 HPLC를 이용하여 분석하였다. 20여종의 아미노산과 셀레노-D,L-메티오닌을 표준시료(Fig. 4)로 하여 본 시료에서 얻어진 분석자료와 비교하여 다음

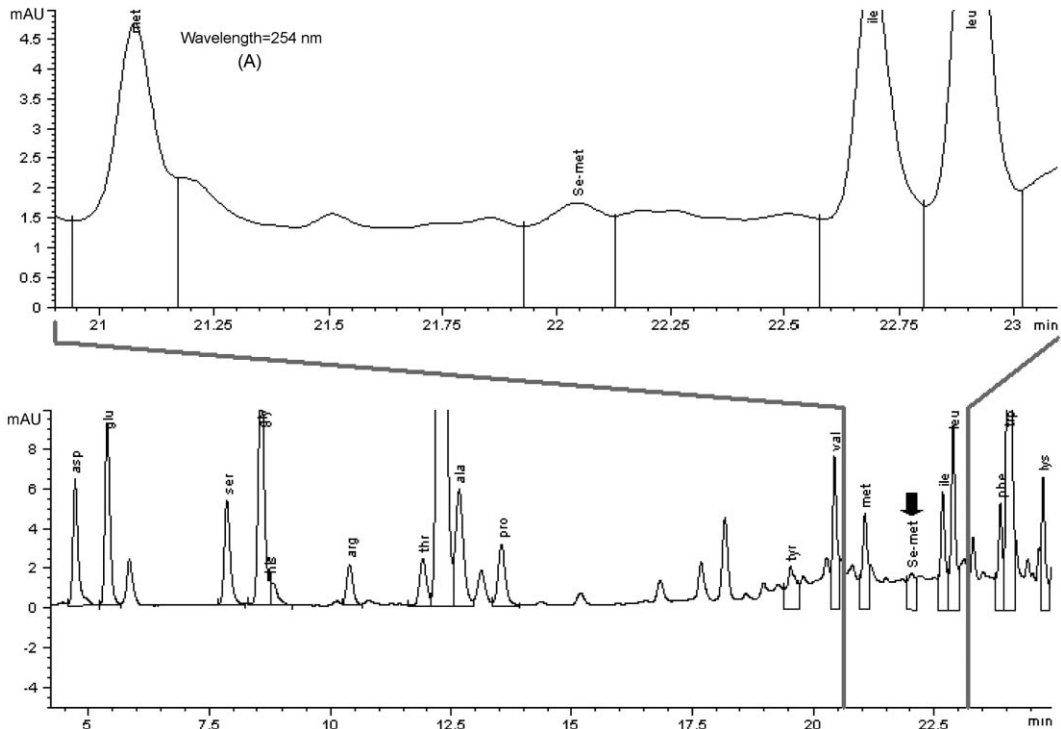


Fig. 5. The HPLC analysis of amino acid of protein (47 kDa) in yeast.

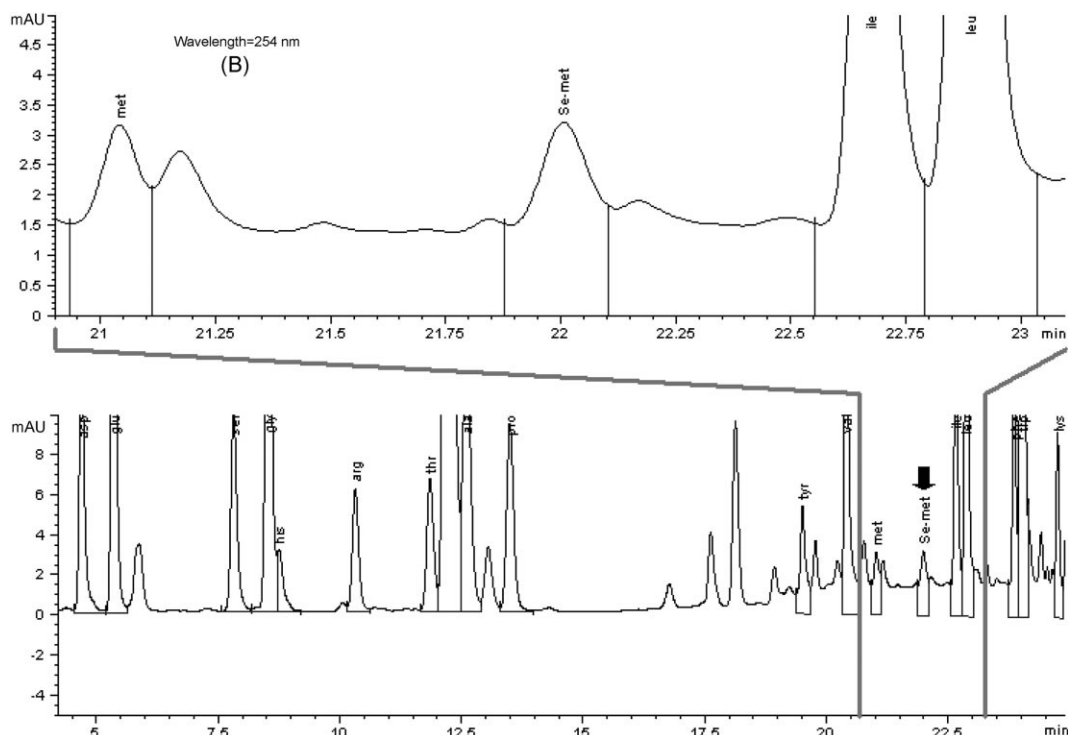


Fig. 6. The HPLC analysis of amino acid of protein (47 kDa) in selenium enriched yeast.

과 같은 결과를 얻었다. 일반적인 아미노산 중 트립토판 20%, 글루타민산 7.0%, 글라이신 11.0%, 알라닌 8.2%, 발린 6.7%, 루이신 6.6%, 이소루이신 4.5% 등의 비율로 확인되었으며 셀레노메티오닌은 2.0%로 확인되었다(Fig. 6). 또한 셀레늄을 주입하지 않은 효모의 일반적인 아미노산은 셀레늄-효모와 비슷한 분포를 보였고 셀레노메티오닌은 0.0% 미만으로 측정되었다(Fig. 5). 일반적인 효모에도 셀레노메티오닌이 함유되어 있지만 본 실험에는 측정할 수 없는 미량으로 추측된다.²² 이 두 결과는 총 아미노산(%)의 상대적인 분포도 값이다.

Na_2SeO_3 을 효모에 feeding 하였을 때 유기셀레늄으로 변환되며 단백질내의 셀레늄농도는 발현되는 단백질의 양에 비례한다. 단백질내의 셀레늄은 단백질과 킬레이트의 형태로 존재하는 것이 아니고 대부분이 셀레늄의 유기체인 셀레노메티오닌으로 효모 내에서 생합성된다고 볼 수 있다.

이 연구는 2002학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

인용문헌

1. Feng, Y.; Finley, J. W.; Davis, C. D. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2384.
2. Bronzetti, G.; Cini, M.; Andreoli, E.; Caltavuturo, L.; Panunzio, M.; Della Croce, C. *Mutat. Res.* **2001**, *496*, 105.
3. Arivazhagan, P.; Thilakavathy, T.; Panneeselvam, C. *J. Nutr. Biochem.* **2000**, *11*, 122.
4. Fischer, A.; Pallauf, J.; Gohil, K.; Udo W.; Packer, S. L.; Rimbach, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 470.
5. Chen, C.; Zhao, J.; Zhang, P.; Chai, Z. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 426.
6. Chen, C.; Zhang, P.; Hou, X.; Chai, Z. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1427*, 205.
7. Plecko, T.; Nordmann, S.; Rügauer, M.; Kruse Jarres, J. D. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *363*, 517.
8. Stapleton, S. R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1823.
9. Persson M., M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1836.
10. Ip, C. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1845.
11. Golubev, V. I.; Golubev, N. V. *Microbiology* **2002**, *71*, 455.
12. Demirci, A.; Pometto III, A. L. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2491.

13. Demirci, A.; Pometto III, A. L.; J. Cox, D. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2496.
 14. Park, S. O.; Kim, M. D.; Han, K. C.; Jeun, Y. S.; Ahn, J. W.; Han, N. S.; Seo, J. H. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *17*, 34.
 15. Oh, S. J.; Oh, Y. T.; Yoon, W. Y.; Park, S. B. *J. Kor. Pharm. Sci.* **1994**, *24*, 29.
 16. Sidenius, U.; Gammelgaard, B. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *367*, 96.
 17. Bird, S. M.; Uden, P. C.; Tyson, J. F.; Block, E. Denoyer, E. *J. Anal. At. Spectrum.* **1997**, *12*, 785.
 18. Bird, S. M.; Ge, H. Uden, P. C.; Tyson, J. F.; Block, E.; Denoyer, E. *J. Chromatogr. A.* **1997**, *789*, 349.
 19. Ipolyi, I.; Sterfánka, Z.; Fodor, P. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 367.
 20. Ponce de L., C.; Sutton, K. L.; Caruso, J. A.; Uden, P. C. *J. Anal. At. Spectrum.* **2000**, *15*, 1103.
 21. Larsen, E. H.; Hansen, M. Fan.; T. Vahl, M. *J. Anal. At. Spectrum.* **2001**, *16*, 1403.
 22. Ip, C.; Birringer, M.; Block, E.; Kotrebai, M.; Tyson, J. F.; Uden, P. C.; Lisk, D. J. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2062.
-