국내 밀 품종의 2차원 전기영동 분석을 통한 고분자 글루테닌 분석

이종열¹ · 박철수² · 김효정¹ · 김주형¹ · 김민숙¹ · 김영태³ · 강천식⁴ · 임선형¹ · 하선화⁵ · 안상낙⁶ · 김영미^{1*}

¹국립농업과학원, ²전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과, ³오믹시스, ⁴국립식량과학원,

⁵경희대학교 생명과학대학 유전공학과, ⁶충남대학교 농업생명과학대학 농학과

Two-dimensional Electrophoresis of High Molecular Weight Glutenin Subunits in Korean Wheat Cultivars

Jong-Yeol Lee¹, Chul-Soo Park², Hyo-Jung Kim¹, Joo-Hyung Kim¹, Min-Suk Kim¹, Yeong-Tae Kim³,
Chon-Sik Kang⁴, Sun-Hyung Lim¹, Sun-Hwa Ha⁵, Sang-Nag Ahn⁶, and Young-Mi Kim^{1*}

¹National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

²Department of Crop Science and Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

³Omicosis, Inc., BVC, KRIBB, Daejeon 305-333, Korea

⁴National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

⁵Department of Genetic Engineering and Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University,
Yongin 446-701, Republic of Korea

⁶Department of Agronomy, Chungnam National University, Daejeon 357-764, Korea

Abstract : To evaluate qualitative and quantitative expression level of HMW-GS protein, we separated glutenin fractions and conducted two-dimensional electrophoresis (2DE) in 32 Korean wheat cultivars. The average spot numbers of HMW-GS in Korean wheat cultivars were 11.78 which included 1.31, 5.53 and 4.94 spots at *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* loci, respectively. Cultivars harboring 1, 2* subunits had more spots than ones with null allele in *Glu-A1* locus because *Glu-B1* and *Glu-D1* loci did not show difference in spot number. A large variation in the total spot number of HMW-GS was observed ranging from 7 (Dahong) to 18 (Jokyoung). Relative expression level of Korean wheat cultivars when compared with the check accession Chinese Spring ranged from 24% (Eunpa) to 111% (Gobun) with an average of 44%. Korean wheat accessions could be classified into six groups based on the number of HMW-GS spots and quantification value of each spot.

Keywords : HMW-GS, Two-dimensional electrophoresis, Relative expression level, Dendrogram

서 언

밀 저장 단백질인 글루테닌의 10%를 차지하는 고분자량 글루테닌(high molecular weight glutenin subunit, HMW-GS)은 글루테닌의 탄성에 매우 중요하므로 밀의 가공적성에 결정적이다(Payne 1987, Gianibelli et al. 2001). 이러한 HMW-GS를 조절하는 유전자는 1번 염색체 장완(long-arm)에 위치해 있으며, 이들 유전자좌는 각각 *Glu-A1*, *Glu-B1*과 *Glu-D1*으

로 명명되었다(Payne 1987). *Glu-A1* 유전자좌에서는 하나의 HMW-GS 단백질이 발현 또는 발현되지 않으며, *Glu-B1* 유전자좌에서는 한개 또는 두개의 해당 단백질이 발현되고, *Glu-D1* 유전자좌에서는 두개의 단백질이 발현되므로 HMW-GS는 최소 3개에서 최대 5개의 단백질이 발현된다(Payne 1987). HMW-GS와 빵 품질과의 상관 관계 분석을 통하여 각각의 HMW-GS에 대한 제빵 능력을 점수화한 *Glu-1* 점수 체계가 확립되었다(Payne & Lawrence 1983, Payne 1987). *Glu-1* 점수 체계를 이용하여 세계 각국의 품종, 계통 및 유전자원에 대한 평가가 이루어졌으며, 현재 세계 각국은 빵용 밀 품종 육성을 위해 HMW-GS 분석을 적극적으로 활용하고 있

*Corresponding author (E-mail: ymikum@korea.kr, Tel: +82-31-299-1674, Fax: +82-31-299-1672)

(Received on July 7, 2013. Revised on August 12, 2013.

Accepted on August 19, 2013.)

다(Payne & Lawrence 1983, Payne et al. 1983, Payne et al. 1987, Branlard et al. 2003, Graybosch 1992, Hong & Park 1998, Redaelli et al. 1997) Payne and Lawrence, 1983 P.I. Payne and G.J. Lawrence, Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat, *Cereal Research Communications* 11 (1983), pp. 29-35.

국내 밀 품종의 *Glu-1* 조성을 분석한 결과, 3개 유전자좌 변이가 나타나 총 9개의 유전적 변이를 보였고, null (*Glu-A1c*), 7 + 8 (*Glu-B1b*) subunits과 2.2 + 12 (*Glu-D1f*) subunits에서 발생 빈도가 높게 나타났다(Park et al. 2009). 외국 밀 품종의 *Glu-1* 조성과의 비교하면, 7 + 8 subunits에서 높은 발생 빈도는 차이가 없었지만, null과 2.2 + 12 subunits에서 높은 발생 빈도는 일본 밀 품종과 유사하였으며, *Glu-A1*의 null subunit에서 높은 발생 빈도는 프랑스 밀 품종과 유사하였다(Oda et al. 1992, Branlard et al. 2003). Shewry et al. (1992)은 빵용에 적합한 품종은 *Glu-1* 조성에서 *Glu-A1*의 1 이나 2* subunit, *Glu-B1*에서 7 + 8 또는 17 + 18 subunits, *Glu-D1*에서 5 + 10 subunits이 존재해야 한다고 제안하였으며, 이들 subunits중에서도 5 + 10 subunits는 반드시 필요하다고 하였다. 그러나 2.2 + 12 subunits에서 변이 발생이 높은 국내 밀 품종은 단백질 함량이 유사한 미국 밀 품종과 비교했을 때 침전가와 반죽수량이 높았으나 제빵적성은 열악하였다(Park et al. 2006). 국내 밀 품종 중 금강밀, 알찬밀, 조경밀, 조농밀 및 탑동밀은 5 + 10 subunits이 존재하며 외국산 빵용 밀 품종에 비해 제빵적성은 떨어지나 2.2 + 12 subunits을 보유한 다른 밀 품종보다는 제빵 적성이 양호한 것으로 보고된 바있다(Park et al. 2011).

HMW-GS 분석은 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 주로 분석하고 있지만(Payne et al. 1979), 최근에는 RP-HPLC (reversed-phase high-performance liquid chromatography), HPCE (high-performance capillary electrophoresis), MS (mass spectrometry) 및 MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry)를 이용하여 분석하고 있다(Bietz 1983, Courcoux et al. 1992, Bean and Bietz 1998, Garozzo et al. 1999, Foti et al., 2000, Cozzolino et al. 2001 a, 2001b, Cunsolo et al. 2003,

Alberghina et al. 2005, An et al. 2006, Chen et al. 2007, Liu et al., 2009). SDS-PAGE가 HMW-GS를 분자량에 따른 단순한 비교임에 반하여 상기의 분석 기술은 HMW-GS의 정성 및 정량적인 분석이 가능하고, *Glu-1* 유전자좌에서 발현되는 새로운 다양한 단백질의 동정에도 이용되고 있다.

지난 30년 동안 국내 밀의 육종은 수량 증대와 숙기 단축에 있어서 많은 성과를 내었으나, 이로 인하여 *Glu-1* 조성에서는 협소한 유전적인 다양성을 보이고 있어 국내 밀의 가공 적성 향상이 제한적으로 이루어지고 있다. 본 연구에서는 국내 밀 품종의 *Glu-1*의 이차원전기영동으로 HMW-GS 발현의 정성적인 분석뿐만 아니라 정량적인 분석을 수행하여 각 품종의 HMW-GS 발현 정도를 평가하였고, 국내 밀 품종 육성의 기초자료로 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 연구에 사용된 재료는 농촌진흥청 국립식량과학원 벼맥류부 증식 포장에서 전작조건으로 재배하여 2010년에 수확된 금강밀 등 32 품종과 Chinses Spring을 미국 농업연구청(National Plant Germplasm System)에서 분양 받아 이용하였다. 종실은 cyclone sample mill (Udy, Fort Collins, 미국)을 이용하여 분쇄하였다.

글루테닌 추출

글루테닌 추출은 Singh et al. (1990) 방법에 준하였다. 분쇄한 밀 종실 500 mg에 50% (v/v) propanol을 25 ml을 넣고 65℃에서 30분간 침지한 후에 10,000 × g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 침전물에 50% (v/v) propanol 12.5 ml을 넣고 30분간 침지 후, 10,000×g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 이러한 과정을 통하여 상등액에 추출된 글리아딘을 제거하였으며, 남은 침전물에 1% (w/v) Dithiothreitol (DTT)를 첨가한 50% (v/v) propanol, 0.08 M Tris-HCl pH 8.0을 2.5 ml 넣고 65℃에서 30분간 침지한 후, 10,000 × g에서 5분간 원심 분리하였다. 단백질 알킬화를 위해 상등액에 1.4% (v/v) 4-vinylpyridine을 첨가한 50% (v/v) propanol, 0.08 M Tris-HCl pH 8.0을 2.5 ml 넣고 65℃에서 15분간 침지시킨 후, 10,000 × g에서 2분간 원심 분리하여 상등액을 이용하였다.

이차원 단백질 전기영동

2차원 전기영동 분석은 Figure 1에서 보는 바와 같이 수행하였다. 추출된 글루테닌을 15% (v/v) TCA/Acetone으로 -20℃에서 24시간 침전 시킨 후, rehydration buffer [7 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer (pI 3-11, GE healthcare life science, 미국), 18 mM DTT]에 녹였다. 글루테닌의 단백질은 Bradford (1976)법을 이용하여 정량하였다. 글루테닌 100 μ g을 rehydration buffer 100 μ l와 혼합하여 18 cm IPG strip에 로딩하고 IPGphor system (Amersham Biosciences, GE healthcare life science, 미국)을 이용하여 20℃에서 15시간 rehydration 시켰다. 등전점 전기영동(isoelectric focusing, IEF)은 200 V에서 1시간 유지한 후 500 V 조건에서 1시간, 이후 1,000 V으로 1시간, 8,000 V까지 전압을 상승시킨 후 3시간 수행하였고, 이후 8,000V로 고정하여 7시간 30분 동안 전체 전압 69.7 KWh 되도록 하였다. 이후에 IPG strip을 equilibration buffer (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 29.3% glycerol, 2% SDS, 1% DTT)에 15분간 처리한 후, DTT를 제외한 2.5% iodoacetamide 첨가 equilibration buffer에서 15분간 처리하여 10% SDS-polyacrylamide gel로 2차원 전기영동을 실시하였다. 전기영동 완료한 젤을 comassie blue R-250로 3시간 염색하고 10% trichloroacetic acid로 3시간 destaining 하였다. 2차원 전기영동 젤의 이미지 분석은 Image Master Platinum 6.0 (GE healthcare life science, 미국)로 실시하였다.

각 품종의 글루테닌 추출은 2회 실시하였고, 추출된 각 샘플은 각각 1회씩 2차원 전기영동을 반복 실시하였다. 각 품종에 대한 2차원 전기영동 결과의 정량 분석은 단백질(spot)의 농도(intensity)와 부피(volume)값을 이용하였으며, 각 품종의 HMW-GS 정성 분석은 Image Master Platinum 6.0 (GE healthcare life science, 미국)을 이용하여 분석하였다. 품종별 HMW-GS 단백질의 2DE 양상을 분석하기 위해 모든 품종의 2차원 전기영동 기준 지도(reference map)를 중첩하여 모든 단백질들을 포함하여 만들어진 가상의 합성 젤을 만들었다. 이를 바탕으로 해서 각 품종의 상대적인 HMW-GS 단백질의 발현량을 조사하였다. 각 품종의 HMW-GS 정량 값은 Chinese Spring의 정량 값을 1로 한 상대적인 발현량으로 산출하였다.

유연관계 분석

유연관계 분석을 위하여 가상의 합성 젤에 있는 모든 단백질 spots에 번호를 부여하였고, 각 품종의 2차원 전기영동 HMW-GS 기준지도에서 각각의 단백질 유무를 이진법 형태의 데이터로 전환하여 분석하였다. Phylogenetic dendrogram 구축을 위하여 Nei (1973)의 방법에 따라 개별 품종간 유전적 거리를 계산하였으며 PowerMarker ver. 3.23 (Liu & Muse 2005) 과 MEGA4 (Tamura et al. 2007)의 분석프로그램을 이용하였다.

Fig. 1. Procedure for analysis of two-dimensional electrophoresis in this study.

결과 및 고찰

2차원 전기영동을 이용한 국내 밀 품종 분석

2차원 전기영동을 이용하여 글루테닌 분석 최적 조건을 찾기 위하여 금강밀을 이용하였다. 추출한 글루테닌을 각각 80% 아세톤과 15% TCA (trichloro acetic acid)를 함유한 아세톤에 침전시켰는데 15% TCA를 함유한 아세톤에서 글루테닌 침전이 양호하였다. 글루테닌 단백질량과 전압의 비교 분석을 위하여, 각각 70, 100과 150 μ g 글루테닌을 37.7, 69.7, 85.7 kVh 에서 등전점 전기영동을 실행한 결과 Figure 2에 제시한 바와 같이 글루테닌 100 μ , 69.7 kVh의 분석조건이 양호하여 이후 국내 밀 품종은 동일한 조건으로 HMW-GS 분석을 실시하였다.

국산 밀 32 품종을 pI 3-11으로 2차원 전기영동(IEF $\times$ SDS-PAGE)를 실시한 결과는 Figure 3에서 제시하였다. Table 1은 국내 밀 32 품종의 2차원 전기영동 분석을 이용한 HMW-GS 분석 결과를 나타내고 있는데, 본 연구의 HMW-GS 분석 결과는 이전의 국내 밀 품종의 HMW-GS분석 결과와 일치하였다(Park et al. 2011). 국내 밀 품종의 HMW-GS 1차원 전기영동의 결과(Park et al. 2011)와 본 연구의 2차원 전기영동의 결과를 종합해보면 *Glu-A1*에서 단백질이 발현 되

지 않는 품종의 분포가 5.15% (17 품종)으로 가장 많았으며, 14개 품종에서는 2* subunit이 발현되었고, 조정밀과 조농밀이 1 subunit 발현이 확인되었다. *Glu-B1*에서는 7 + 8 subunits을 발현하는 품종이 22 품종으로 전체 66.7%를 차지하였으며, 7 + 9 subunits과 13 + 16 subunits을 발현하는 품종은 각각 4 품종과 7 품종이었다. *Glu-D1*에서는 2.2 + 12 subunits을 발현하는 품종이 23 품종으로 전체 69.7%를 차지하였으며, 2 + 12 subunits과 5 + 10 subunits을 발현하는 품종은 각각 4 품종과 6 품종이었다.

국내 밀 품종의 HMW-GS에 대한 2차원 전기영동은 1차원 SDS-PAGE와 달리 각각의 *Glu-1* 유전자좌에서 여러 개의 isoform 단백질을 발현하였고 결과는 Table 2에 정리하였다. 이들 isoform 형태의 스팟들을 동정하기 위해 국산 밀 품종의 HMW-GS 이차원 전기영동 젤에서 각 유전자좌의 isoform들을 모두 취하여 트립신 in-gel digestion 후 LC-ESI MS/MS로 해당 유전자좌의 HMW-GS임을 동정하였다. HMW-GS의 이차원 전기영동을 통하여 국내밀 품종의 다양한 단백질 발현양상뿐만 아니라 발현양의 차이도 확인할 수 있었다. 이러한 차이는 SDS-PAGE에서 구별이 불가능한 품종 고유의 특징을 구별할 수 있다. 또한 각각의 단백질에 대한 특징적인 발현양상을 기반으로 국내 밀 품종과 주요 외국 밀 품종과 비

Fig. 2. Comparison of 2DE patterns of glutenin proteome at various conditions in wheat cultivar “Keumkang”. Voltage in IEF step and total glutenin weight loaded are indicated.

교를 통한 국내 밀 품종 판별 표지인자 개발 연구도 필요할 것으로 생각된다. 최근 들어 국산밀에 대한 선호도가 증가하고 있기 때문에 향후 국산 밀과 수입 밀을 구별할 수 있는 표지인자의 개발은 필요하다. 일본 밀과 캐나다 밀 품종간의 차이를 보여주는 특이 단백질 동정을 통하여 캐나다 수입밀과 일본 자국밀을 구별할 수 있는 단백질을 확인하였다(Yahata et al. 2006).

Glu-A1 유전자좌에서는 평균 1.3개의 단백질이 발현됐으

며, 단백질을 발현하지 않는 null subunit은 2차원 전기영동에서도 단백질 발현이 전혀 이루어지지 않았고, 1 subunit을 발현하는 조경밀과 조농밀은 각각 4개와 2개의 단백질을 발현하는 것으로 나타났다. 특히, 다중밀은 2* subunit의 isoform이 4개 존재하였으며, 나머지 품종은 평균 2.5개의 단백질이 발현되었다. 그러므로 1과 2* subunit에서 단백질 발현 개수는 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다. *Glu-A1*과 달리 *Glu-B1*과 *Glu-D1*은 대부분 1차원 SDS-PAGE에서 각각 2개의

Fig. 3. 2DE patterns of HMW-GS fraction of Korean wheat cultivars. Name of the cultivars are indicated in the below at the left.

Fig. 3. Continued.

단백질 발현하는데 분자량이 큰 단백질은 x-type이고 분자량이 작은 단백질이 y-type이다(Gianibelli et al. 2001). *Glu-B1*에서 발현된 단백질 스팟은 5.5개로 x-type이 3.1개, y-type이 2.4개로 나타났다. 7 + 8 subunits을 발현하는 단백질에서는 평균 5.4개 스팟, 7 subunit을 가지는 품종은 평균 3.0개의 단백질 스팟, 8 subunit을 보유한 품종은 평균 2.4개의 단백질 스팟을 확인할 수 있었다. 7 + 8 subunits을 발현하는 품종 중에서 금강밀은 7 subunit의 단백질 스팟이 5개로 가장 많았으며, 청계밀, 올밀과 탐동밀은 2개의 단백질 스팟을 나타내

었다. 8 subunit을 발현하는 품종에서는 다홍밀, 한백밀과 탐동밀이 1개의 단백질 스팟을 발현하였으며, 진품밀을 포함한 10개 품종은 3개의 단백질 스팟을 나타내었다. 7 + 9 subunits을 발현하는 4개 품종의 평균 단백질 스팟수는 5.5개로 7 + 8 subunits을 발현하는 품종과 차이가 없었으며, 7 subunit과 9 subunit을 발현하는 단백질 스팟 평균수도 각각 3.0과 2.5개로 품종간 차이가 없었다. 13 + 16 subunits을 발현하는 품종의 평균

단백질 스팟수는 5.8개였으며, 13 subunit과 16 subunit을

발현하는 단백질 평균 스팟수는 각각 3.4와 2.4로, 13 subunit에서 발현되는 단백질이 많았다. 수강밀은 13 subunit에서는 가장 많은 5개 단백질을 보였고, 16 subunit에서는 가장 적은 1개의 단백질 스팟을 확인하였으며, 다른 품종들은 큰 차이가

없었다. *Glu-B1*과 *Glu-D1*의 전체 단백질 발현에는 차이가 없었지만, *Glu-A1*에서는 1과 2* subunit이 null에 비하여 전체 단백질 발현 개수가 많은 것으로 확인되었다(Fig. 4-A.). 국내 밀 품종의 상대적인 HMW-GS 발현량을 비교하기 위

Table 1. Allelic compositions of HMW-GS (high molecular weight glutenin subunit) and relative expression level of HMW-GS at *Glu-1* loci in Korean wheat cultivars by 2DE.

Cultivars	HMW-GS (<i>Glu-1</i>)			Relative Expression Level
	Allelic composition			
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	
Alchan	2*	7 + 8	5 + 10	0.48
Anbaek	N	7 + 9	2 + 12	0.39
Baekjoong	2*	13 + 16	2.2 + 12	0.24
Chungkye	N	7 + 8	2.2 + 12	0.34
Dabun	2*	7 + 8	2.2 + 12	0.49
Dahong	N	7 + 8	2.2 + 12	0.52
Dajoong	2*	13 + 16	2.2 + 12	0.55
Eunpa	N	7 + 9	2.2 + 12	0.24
Geuru	N	7 + 8	2.2 + 12	0.31
Gobun	N	7 + 9	2 + 12	1.11
Goso	2*	7 + 8	2.2 + 12	0.40
Hanbaek	2*	7 + 8	5 + 10	0.24
Jeokjoong	2*	13 + 16	2.2 + 12	0.41
Jinpoom	N	7 + 8	2.2 + 12	0.44
Joeun	N	13 + 16	2.2 + 12	0.52
Jokyung	1	7 + 8	5 + 10	0.36
Jonong	1	7 + 8	5 + 10	0.34
Jopoom	N	13 + 16	2.2 + 12	0.55
Keumkang	2*	7 + 8	5 + 10	0.45
Milsung	N	7 + 8	2.2 + 12	0.32
Namhae	N	7 + 8	2.2 + 12	0.30
Ol	N	7 + 8	2.2 + 12	0.39
Olgeuru	2*	7 + 8	2.2 + 12	0.28
Saeol	N	7 + 8	2.2 + 12	0.28
Seodun	N	7 + 8	2.2 + 12	0.65
Sinmichal	2*	7 + 8	2.2 + 12	0.33
Sinmichal 1	N	7 + 9	2.2 + 12	0.29
Suan	2*	7 + 8	2.2 + 12	0.39
Sukang	2*	13 + 16	2 + 12	0.70
Tapdong	2*	7 + 8	5 + 10	0.79
Uri	N	7 + 8	2.2 + 12	0.50
Younbaek	2*	13 + 16	2.2 + 12	0.43
Chinese Spring	N	7 + 8	2 + 12	1.00

하여 밀 유전 분석에서 표준 품종으로 이용되는 Chinese Spring을 1로 기준하여 각각의 *Glu-1* 유전자좌에서 발현된 각 단백질의 발현량을 비교 분석하였다(Table 1). 국내 밀 품종의 HMW-GS 발현량은 0.44로 표준 품종인 Chinese Spring에 비하여 낮았으며, 고분밀이 1.11로 다른 품종에 비하여 HMW-GS 발현이 월등히 높았다. 탐동밀과 수강밀의

발현량은 각각 0.79와 0.70으로 높았으며, 백중밀, 은파밀, 한백밀, 올그루밀, 새올밀, 신미찰 1호와 남해밀은 0.30이하로 낮았다. 국내 밀 품종 중에서 *Glu-1* 제빵적성점수가 10점인 금강밀, 조정밀, 알찬밀, 조농밀, 한백밀과 탐동밀의 발현량은 탐동밀을 0.50 이하로 분석되었다. Chinese Spring의 글루텐의 점탄성이 강한 품종이 아닌 것을 감안한다면 국내 밀 품종

Table 2. Number of HMW-GS isoforms at each *Glu-1* loci in Korean wheat cultivars by 2DE.

Cultivars	Isoforms of HMW-GS at <i>Glu-1</i> loci					Total
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>		<i>Glu-D1</i>		
	<i>Alx</i>	<i>Blx</i>	<i>Bly</i>	<i>Dlx</i>	<i>Dly</i>	
Alchan	2	3	2	1	2	10
Anbaek	0	3	2	2	2	9
Baekjoong	2	3	3	2	3	13
Chungkye	0	2	2	2	3	9
Dabun	3	3	2	3	3	14
Dahong	0	3	1	1	2	7
Dajoong	4	4	2	3	3	16
Eunpa	0	3	3	3	3	12
Geuru	0	4	3	3	3	13
Gobun	0	3	2	3	2	10
Goso	3	4	2	4	2	15
Hanbaek	3	3	1	1	2	10
Jeokjoong	2	3	3	2	3	13
Jinpoom	0	3	3	2	2	10
Joeun	0	3	3	3	3	12
Jokyung	4	3	3	4	4	18
Jonong	2	3	3	2	3	13
Jopoom	0	3	2	2	2	9
Keumkang	2	5	3	2	2	14
Milsung	0	3	2	2	2	9
Namhae	0	3	2	1	2	8
Ol	0	2	2	3	4	11
Olgeuru	2	3	3	2	3	13
Saeol	0	3	3	2	2	10
Seodun	0	3	3	3	2	11
Sinmichal	3	3	3	3	3	15
Sinmichal 1	0	3	3	3	3	12
Suan	3	3	3	2	3	14
Sukang	3	5	1	2	3	14
Tapdong	2	2	1	1	2	8
Uri	0	3	3	3	2	11
Younbaek	2	3	3	3	3	14

의 HMW-GS의 낮은 발현양은 밀가루 반죽의 점탄성 및 가공 적성에 영향을 미치는 중요한 요인으로 작용함을 시사한다.

밀 반죽의 가공적성에 관련된 글루텐의 점탄성은 글루테닌 분자간 결합(Inter-molecular cross-linking)을 위한 HMW-GS N-말단과 C-말단 도메인에 위치하는 시스테인의 개수와 위치에 의해 결정된다(Belton 1999). 글루테닌 분자간 결합이 많으면 많을수록 탄성이 증가하고, 적을수록 신장성이 증가한다(Feeney et al. 2003). 5 + 10 subunits 를 지닌 밀 품종은 2 + 12 subunits를 지닌 품종에 비하여 반죽의 점탄성이 강한데 이러한 차이는 시스테인 잔기의 개수 차이에 기인하는 것으로 알려져 있다(Popineau et al. 1994). 그러나 국내 품종에서는 2 + 12 subunits을 지닌 품종의 평균 발현양은 0.73으로 5 + 10 subunits 을 지닌 품종의 평균 발현양 0.44 보다 높았다. 2.2 + 12 subunits의 평균 발현양은 0.40으로 5 + 10 subunits 과 비슷하였다(Fig. 4-B). 그러나 다른 유전자좌에서는 차이가 없는 것으로 나타났다.

말단 부분의 시스테인 잔기이외 중심부의 반복 도메인의 구조와 길이에 의해 HMW-GS의 점탄성이 결정되는데, HMW-GS의 중심 도메인은 반복된 모티프(motif)가 β -reverse turn spiral 형태를 이루어 안정적인 구조를 형성한다. 이러한 구조의 변형과 이완이 글루텐의 탄성을 결정하게 된다(Belton et al. 1995). 또한 반복 도메인은 주로 글루타민으로 구성되어 이들간의 수소 결합이 HMW-GS 구조의 안정성을 증가시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Yeboah et al. 1994). 그러나 HMW-GS를 포함한 글루텐의 점탄성에 대한 분자수준의 메커니즘은 아직까지 불분명하다. 본 연구에서 국내 밀 품

종의 HMW-GS의 상대적인 발현양이 낮다는 것은 반죽 형성 시 점탄성이 약하게 되는 요인으로 작용하여 빵을 포함하여 강한 점탄성이 요구하는 가공제품의 품질에는 좋지않은 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있다. 본 연구에서는 단백질 발현양의 상대적인 비교분석을 수행하였지만 향후 절대적인 발현양의 연구가 수행되어야 할 것이다. 단백질 발현양이 가장 높은 고분밀은 국내 밀의 HMW-GS 발현양 향상을 위한 육성 소재로 이용이 가능하며, 국내 밀의 제빵 적성을 높이기 위해서는 5 + 10 subunits을 지닌 계통 위주의 선발뿐만 아니라 단백질 발현양을 높이는 방향으로 연구가 진행되어야 할 것이다.

본 연구에서 국내 밀 품종의 HMW-GS 단백질이 여러 개의 isoform으로 이루어져 있음을 확인하였는데, HMW-GS 단백질은 phosphorylation이나 glycosylation과 같은 번역 후 변형(post-translation modification, PTM)이 가능하다고 알려져 있다(Alberghina et al., 2005, Cozzolino et al., 2001 a, b, Cunsolo et al., 2003), 그러나 일부 연구 결과에서는 HMW-GS의 PTM을 확인하지 못하였다(Roels and Delcour 1996, Zhang et al., 2008). 국내 밀 품종 중에서 금강밀과 우리밀을 이용하여 이차원 전기영동 후 PTM분석을 위해 phosphorylation과 glycosylation staining을 실시하였으나 확인할 수 없었다(Data not shown). 이러한 결과는 HMW-GS는 PTM 보다는 염색체상 multicopy HMW-GS 유전자가 존재하는 것으로 예상되는데 이를 확인하기 위해서는 genomic southern hybridization 같은 분석이 수행되어야 하리라 생각된다.

Fig. 4. Total number of HMW-GS isoforms in Korean wheat cultivars including *Glu-A1* allele by 2DE (Top) and relative expression level of HMW-GS compared to Chinese spring in Korean wheat cultivars including 2+12, 5+10 and 2.2+12 subunits by 2DE (Bottom).

이차원 전기영동 분석 결과를 이용한 연관 분석

HMW-GS의 이차원 단백질 전기영동을 통한 국내 밀 품종의 발현된 모든 단백질 스팟들과 해당 단백질의 정량값을 이용하여 근연관계를 분석한 결과는 Figure 5에서 보는바와 같다. 국내 품종은 크게 6그룹으로 나눌수 있는데 그룹 I은 조경밀, 밀성밀, 조은밀과 연백밀이 포함되며 HMW-GS 조성에서 조경밀을 제외한 3품종은 모두 2.2 + 12 subunits가 존재하며, HMW-SG 발현양은 평균 0.41정도이며, 단백질 스팟수는 평균 13.25개였는데 조경밀이 18개로 가장 많았고, 밀성밀은 9개로 적었다. 그룹 II는 금강밀, 탑동밀, 알찬밀과 한백밀이 포함되었는데 이들 품종은 모두 2*, 7 + 8과 5 + 10

subunits을 가지며, 국내 품종중에 HMW-GS 조성이 양호한 그룹이다. 금강밀과 탑동밀은 국내 밀 품종 중에서 조경밀과 더불어 제빵에 적합한 품종이다. 특히, 금강밀은 현재 국내 재배되는 밀 품종의 80% 수준을 차지하고 있는 대표적인 품종이다. 이들 품종의 HMW-GS 발현양은 평균 0.49로 그룹 I보다 약간 높았지만 단백질 스팟수는 평균 10.50개로 전체 그룹중에 가장 낮았다. 그룹 III은 진품밀, 다분밀과 고소밀이 포함되는데 이들 품종은 공통적으로 7 + 8과 2.2 + 12 subunits을 보유하며, HMW-SG 발현양은 평균 0.44로 그룹 I과 II의 중간 정도 이고, 단백질 스팟수는 평균 13.00개로 그룹 I과 유사하였다. 특히, 고소밀은 2010년에 육성된 과자 적성이 우

Fig. 5. Dendrogram according to genetic distance based on frequency of HMW-GS spots and quantification value of each spot to HMW-GS spots of the synthetic gel including all spots in Korean wheat cultivars by 2DE.

수한 품종이다. 그룹 IV는 다중밀, 조품밀, 적중밀과 백중밀이 포함되는데 이들 품종은 13 + 16과 2.2 + 12 subunits을 보유하며, HMW-SG 발현량은 평균 0.44로 그룹 III과 비슷하고, 단백질수는 평균 12.75개로 그룹 I이나 III과 유사하였다. 이들 품종은 2000년 이후에 육성된 품종으로, 조품밀은 현재 재배되고 있는 국내 밀 품종 중에 가장 조숙인 품종이며, 다중밀, 백중밀과 적중밀은 국수용에 적합한 품종이다. 특히, 백중밀은 백립계이면서 수발아 중도저항성이고 수량성이 양호하여 최근 전라남도 지역에서 금강밀 대체용으로 재배면적이 늘어나고있는 품종이다. 그룹 V는 그루밀을 포함하여 12 품종이 속하는데 수안밀을 제외한 품종은 2000년 이전에 육성된 품종으로 그룹 III과 같이 7 + 8과 2.2 + 12 subunits을 보유하며, HMW-SG 발현량은 평균 0.38로 전체 그룹중에 가장 낮으며, 단백질 스왓수는 평균 11.17개로 낮았다. 그룹 VI은 7 + 9 subunits 을 지닌 조농밀, 신미찰 1호, 수강밀, 안백밀과 고분밀이 포함되는데, HMW-SG 발현량은 평균 0.62로 전체 그룹중에 제일 높았다. 이는 발현량이 높은 품종인 고분밀과 수강밀이 포함되어있음에 기인하며, 단백질 스왓수는 평균 11.25개로 그룹 V와 비슷하였다. 그룹 V와 VI에는 신미찰밀과 신미찰1호가 포함되어 있는데 이품종 들은 국내에서 육성된 찰성밀로 혼반용으로 판매되고 있다.

적 요

이차원 전기영동 분석을 이용하여 국내 밀 32 품종의 HMW-GS 단백질 발현의 정성 및 정량적인 분석을 통해 품종별 HMW-GS 발현 정도를 평가하여 국내 밀 품종 육성의 기초 자료로 활용하고자 수행하였다. 평균 HMW-GS 스왓수는 11.78개였으며, *Glu-A1* 1.31개, *Glu-B1* 5.53개, 그리고 *Glu-D1*에서 4.94 개였다. *Glu-B1*과 *Glu-D1*에서는 subunit에 따른 단백질 스왓 수가 차이가 없기 때문에, *Glu-A1*에서는 1과 2* subunit을 지닌 품종이 null allele 품종에 비하여 단백질 스왓 수가 많았다. 단백질 스왓 수는 조경밀이 18개로 가장 많았으며, 다홍밀은 7개로 제일 적었다. 단백질의 상대적인 발현량을 조사한 결과 평균 0.44로 대비 품종인 Chinese Spring에 비하여(1.0) 낮았고, 고분밀이 1.11로 가장 높았으며, 은파밀이 0.24로 가장 낮았다. 단백질 스왓수와 발현량을 이용한 유연관계 분석 결과, 국내 밀 품종을 6개 그룹으로 분류할 수 있었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ907133, PJ006680)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

1. Alberghina G, Cozzolino R, Fisichella S, Garozzo D, Savarino A. 2005. Proteomics of gluten: mapping of the 1Bx7 glutenin subunit in Chinese Spring. *Theor. Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 2069-2074.
2. An X, Zhang Q, Yan Y, Li Q, Zhang Y, Wang A, Pei Y, Tian J, Wang H, Hsam SLK, Zeller FJ. 2006. Cloning and molecular characterization of three novel LMW-i glutenin subunit genes from cultivated einkorn. *Theor. Appl. Genet.* 113: 383-395.
3. Bean SR, Bietz JA, Lookhart GL. 1998. High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *J. Chromatogr.* 814: 25-41.
4. Belton PS. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 29:103-107.
5. Belton PS, Colquhoun IJ, Field JM, Grant A, Shewry PR., Tatham AS and Wellner N. 1995. FTIR and NMR studies on the hydration of a high Mr subunit of glutenin. *Int. J. Biol. Macromol.* 17: 74.
6. Bietz JA. 1983. Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 255: 219-238.
7. Branlard G, Dardevet M, Amiour N, Igrejas G. 2003. Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in French bread wheat. *Genet. Res. Crop Evol.* 50: 669-679.
8. Bradford MM. 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.
9. Chen J, Lan P, Tarr A, Yan Y, Grancki M, Appels R, Ma W. 2007. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight based wheat gliadin protein peaks are useful molecular markers for wheat genetic study. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 2913-2917.
10. Cozzolino R, Di Giorgi S, Fisichella S, Garozzo D, Lafiandra D, Palermo A. 2001a. Matrix-assisted laser

- desorption/ ionization mass spectrometric peptide mapping of high molecular weight glutenin subunits 1Bx7 and 1Dy10 in Cheyenne cultivar. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* a 15: 778-787.
11. Cozzolino R, Di Giorgi S, Fisichella S, Garozzo D, Lafiandra D, Palermo A. 2001b. Proteomics of gluten: mapping of subunit 1 Ax2* in Cheyenne cultivar by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* b 15: 1129-1135.
 12. Cunsolo V, Foti S, Saletti R, Gilbert S, Tatham AS, Shewry PR. 2003. Structural studies of glutenin subunits 1Dy10 and 1Dy12 by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 442-454.
 13. Courcoux P, Serot T, Larre C, Popineau Y. 1992. Characterization and identification of wheat cultivars by multi-dimensional analysis of reversed-phase high-performance liquid chromatograms. *J. Chromatogr.* 596: 225-235.
 14. Feeney KA, Wellner N, Gilbert SM, Halford NG, Tatham AS, Shewry PR, Belton PS. 2003. Molecular structures and interactions of repetitive peptides based on wheat glutenin subunits depend on chain length. *Biopolym. Biospectrosc.* 72: 123-131.
 15. Foti S, Maccarrone G, Saletti R, Roepstorff P, Gilbert S, Tatham AS, Shewry PR. 2000. Verification of the cDNA deduced sequence of glutenin subunit 1Dx5 and an Mr 58000 repetitive peptide by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *J. Cereal Sci.* 31: 173-183.
 16. Garozzo D, Cozzolino R, Giorgi SD, Fisichella S, Lafiandra D. 1999. Use of hydroxyacetophenones as matrices for the analysis of high molecular weight glutenin mixtures by matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13: 2084-2089.
 17. Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW. 2001. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem.* 78: 635-646
 18. Graybosch RA. 1992. High molecular weight glutenin subunit composition of cultivars, germplasm, and parents of US red winter wheat. *Crop Sci.* 32: 1151-1155.
 19. Hong BH, Park CS. 1998. Genetic variation of high molecular weight glutenin subunit in Korea wheat. *Korean J. Crop Sci.* 43: 259-263.
 20. Liu K, Muse SV. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics.* 21: 2128.
 21. Liu L, Wang AL, Appels R, Ma JH, Xia XC, Lan P, He ZH, Bekes F, Yan YM, Ma WJA. 2009. MALDI-TOF based analysis of high molecular weight glutenin subunits for wheat breeding. *J. Cereal Sci.* 50: 295-301.
 22. Nei M. 1973. The theory and estimation of genetic distance, pp.45-54 in *Genetic Structure of Populations*. Morton NE. eds. University Press of Hawaii, Honolulu.
 23. Oda S, Komae K, Yasui T. 1992. Relation between starch granule protein and endosperm softness in Japanese wheat cultivars. *Jpn. J. Breed.* 42: 161-165.
 24. Payne PI. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on readmaking quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 141-153.
 25. Payne PI, Lawrence GJ. 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high-molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.* 11: 29-35.
 26. Payne PI, Holt LM, Lawrence GJ. 1983. Detection of a novel high molecular weight subunit of glutenin in some Japanese wheats. *J. Cereal Sci.* 1: 3-8.
 27. Payne PI, Seekings JA, Worland AJ, Jarvis MG, Holt LM. 1987. Allelic variation of glutenin subunits and gliadins and its effect on bread making quality in wheat: analysis of F5 progeny from Chinese Spring. *J. Cereal Sci.* 6: 103-118.
 28. Park CS, Pena RJ, Baik BK, Kang CS, Heo HY, Cheong YK, Woo SH. 2009. Allelic variation of glutenin, granule-bound starch synthase I and puroindoline in Korean wheat cultivars. *Korean J. Crop Sci.* 54: 181-191.
 29. Park CS, Baik BK, Kang MS, Park JC, Lim JD. 2006. Flour characteristics and end-use quality of Korean wheats with 1Dx2.2 + 1Dy12 subunits in molecular weight glutenin. *J. Food Sci. Nutr.* 11: 243-252.
 30. Park CS, Kang CS, Jeung JU, Woo SH. 2011. Influence of allelic variations in glutenin on the quality of pan bread and white salted noodles made from Korean wheat cultivars. *Euphytica* 180: 235-250.
 31. Payne PI, Corfield KG, Blackman JA. 1979. Identification of a high-molecular-weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 55: 53-159.
 32. Popineau Y, Cornec M, Lefebvre J, Marchylo B. 1994.

- Influence of high Mr glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of gluten and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat Sicco. *J. Cereal Sci.* 19: 231-241.
33. Redaelli R, Ng PKW, Pogna NE. 1997. Allelic variation at the storage protein loci of 55 US-grown white wheats. *Plant Breed.* 116: 429-436.
 34. Roels SP, Delcour JA. 1996. Evidence for the non-glycoprotein nature of high molecular weight glutenin subunits of wheat. *J. Cereal Sci.* 24: 227-239.
 35. Shewry PR, Halford NG, Tatham AS. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 15: 105-120.
 36. Singh NK, Shepherd KW, Cornish GB. 1990. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.* 14: 203-208.
 37. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596.
 38. Yahata E, Wakako MF, Zenta N, Yoshihiko Y, Akihiro H, Hisashi S, Masatoshi T, Haruo S. 2006. Relationship between the dough quality and content of specific glutenin proteins in wheat mill streams, and its application to making flour suitable for instant Chinese noodles. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 70: 788-97.
 39. Yeboah NA, Freedman RB, Popineau Y, Shewry PR, Tatham AS. 1994. Fluorescence studies of two γ -gliadin fractions from bread wheat. *J. Cereal Sci.* 19: 141-148.
 40. Zhang Q, Dong Y, An X, Wang A, Zhang Y, Li X, Xia X, He Z, Yan Y. 2008. Characterization of HMW glutenin subunits in common wheat and related species by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *J. Cereal Sci.* 47: 252-261.