밀 반수체 계통에서 오메가-5 글리아딘 돌연변이의 선발 및 동정

장유란¹ · 강천식² · 임선형¹ · 이종열^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²농촌진흥청 국립식량과학원

Screening and Identification of Omega-5 Gliadin Mutants in Wheat Doubled-Haploid Lines

You-Ran Jang¹, Chon-Sik Kang², Sun-Hyung Lim¹, and Jong-Yeol Lee^{1*}

¹National Institute of Agricultural Science, RDA, Jeonju, 54874, Korea

²National Institute of Crop Science, RDA, Jeonju, 55365, Korea

Abstract Gliadin proteins are a major component of gluten proteins and important determinants of bread-making quality by conferring the viscosity and extensibility of dough, but also present significant health problems for consumers with wheat-related diseases like celiac disease or wheat allergies. In order to solve this problem, we conducted RP-HPLC analysis to profile gliadin fractions for screening the mutants deficient in gliadins from 122 wheat doubled-haploid (DH) lines cultivated by the National Institute of Crop Science. Comparing the RP-HPLC chromatogram of 122 DH lines with those of the respective parents, we found that some peaks of omega-5 gliadin were not present in 28 DH lines. Further analysis using SDS-PAGE and A-PAGE showed that the omega-5 gliadin in the parental varieties had two to three bands, but only one band in the absent 28 DH lines. The relative expression levels of all gliadin groups in the parental and mutant lines were also examined by RP-HPLC. Our study contributes to establishing a method for the rapid screening and identification of mutants missing gliadins as major epitopes of wheat-related disease in many wheat genetic resources and breeding lines as valuable information to other researchers.

Keywords allergen-reduced wheat, gliadin proteins, mutant, omega-5 gliadin, wheat

Received on April 13, 2018. Accepted on May 19, 2018.

* Corresponding Author (E-mail: jy0820@korea.kr, Tel: +82-63-238-4616, Fax: 063-238-4604)

서 언

밀 저장 단백질은 염에 용해되는 비글루텐 단백질과 용해되지 않는 글루텐 단백질로 분류되며, 이는 각각 밀 단백질의 20~30%와 70~80%를 차지한다. 글루텐 단백질은 다량체로 존재하는 글루테닌과 단량체로 존재하는 글리아딘으로 분류된다(Wieser 2007). 글루테닌은 단백질 1차 구조와 분자량에 따라 약 66-88kDa의 고분자 글루테닌(High molecular weight; HMW-GS)과 약 30-40kDa의 저분자 글루테닌(Low molecular weight; LMW-GS)으로 나뉘며, 분자 내 및 분자 간 이황화 결합을 형성하고, 밀 반죽에 탄성을 부여한다(Cornish et al. 2006, Payne 1987, Singh & Shepherd 1988, Wasik & Bushuk 1975). 고분자 글루테닌은 1번 염색체 장완에 존재하며 *Glu-A1*, *Glu-B1* 그리고 *Glu-D1*에 의해 암호화 된다(Shewry et al. 1995). 6배체 보통 밀은 3-5개의 고분자 글루테닌을 포함하는데, 이는 각각 83-88kDa에 존재하는

x-type과 66-75kDa에 존재하는 y-type으로 분류된다(Forde et al. 1985, Payne et al. 1981, Payne 1987, Payne & Lawrence 1983, Shewry et al. 1995, Wieser 2007). 저분자 글루테닌은 1번 염색체 단완에 존재하며 *Glu-A3*, *Glu-B3* 그리고 *Glu-D3*에 의해 암호화 되고, SDS-PAGE의 이동성(mobility)에 따라 B, C 그리고 D 서브유닛으로 분류된다(D'Ovidio & Masci 2004). 저분자 글루테닌 유전자를 발현시키는 *Glu-3*는 글리아딘 유전자 일부를 발현시키는 *Gli-1* 위치와 염색체 상에서 밀접하게 연관되어 있다(Gao et al. 2007, Pogna et al. 1990, Ruiz & Carrillo 1993, Wieser & Kieffer 2001).

글리아딘은 저장단백질의 40-50%를 차지하는 글루텐의 주요 구성 성분으로(Anderson et al. 1997) 30-75kDa에 존재하고(Fido et al. 1997), 단백질 1차 구조와 낮은 pH의 A-PAGE 또는 SDS-PAGE의 mobility에 따라 α , β -, γ -, ω 5-, ω 1, 2- 글리아딘 4그룹으로 나뉜다(Banc et al. 2009, Wieser 2007). 글리아딘은

이황화 결합을 형성하지 않거나, 사슬 내 이황화 결합을 형성하며, 밀 반죽에 점성 및 신장성을 부여하지만(Khatkar et al. 2002, Wieser 2007), 밀 알러지를 비롯한 심각한 밀 관련 질환을 유발한다.

α β -글리아딘과 γ -글리아딘은 전체 글리아딘 단백질의 28-33%와 23-31%를 차지하는 주요 글리아딘 단백질이고, ω 1, 2-글리아딘은 훨씬 적은 4-7%를 차지한다. α β -글리아딘은 6번 염색체 단완에 존재해 *Gli-A2*, *Gli-B2* 그리고 *Gli-D2*에 의해 암호화 되고, γ -, ω 1, 2-글리아딘은 1번 염색체 단완에 존재해 *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*에 의해 암호화 된다(Brown & Flavell 1981, DuPont et al. 2004, Ferranti et al. 2007, Wieser & Kieffer 2001, Wrigley & Shepherd 1973). α -, γ -, ω 1, 2-글리아딘은 밀 질환인 셀리아병(Celiac Disease; CD)에 불내성(intolerance)을 일으키는 주요 항원이다. 셀리아병은 소화된 밀 글루텐에 대한 과민반응으로 만성염증성질환(chronic inflammatory disease)이며 미국인구의 약 1%에 영향을 미친다(Maki et al. 2003). 셀리아병을 앓고 있는 환자들은 대부분 유전적으로 HLA-DQ2 유전자(소수의 경우 HLA-DQ8)를 가지고 있다(Keuning et al. 1976, Trabace et al. 1984). HLA-DQ는 항원제시세포(antigen presenting cell)에서 TG2 (tissue transglutaminase)에 의해 탈아미드화된 글루텐 펩타이드를 제시하여(Molberg et al. 1998) T-cell에서 비자기(non-self)로 인식하게 해서 부적절한 면역반응을 일으켜 용모 크기 위축 및 점막 평평화에 의해 설사나 흡수장애 증상을 보이게 하며 심하면 사망에까지 이른다(Fasano & Catassi 2001, Johansen et al. 1996, Lundin et al. 1993, Petronzelli et al. 1997). 상당히 빠른 속도로 증가 중이며 유일한 치료방법은 글루텐을 섭취하지 않는 것이다. 셀리아병의 항원인 α -글리아딘의 T 세포 자극 항원 결정기는 PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ 외 3개(Sollid et al. 2012, Tye-Din et al. 2010), γ -글리아딘은 PQQSFPEQQ, IQPEQPAQL 외 9개(Sollid et al. 2012), 그리고 ω 1, 2-글리아딘은 PFPQPQQPF, PQPQQPFPW를 갖는다(Tye-Din et al. 2010).

ω 5-글리아딘은 전체 글리아딘 단백질의 3-6%를 차지하며 1번 염색체 단완에 존재해 *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*에 의해 암호화 된다(Wieser & Kieffer 2001). ω 5-gliadin의 구조는 SRL로 시작되는 N-말단, FPQQQ와 QQIPQQ의 반복서열 및 C-말단으로 구성되어 있다(Battais et al. 2005, Dupont et al. 2004, Matsuo et al. 2005). ω 5-글리아딘은 시스테인을 가지지 않아 이황화결합을 형성하지 않는다(Hisa & Anderson 2001, Kasarda et al. 1983). 또한 낮은 수준의 라이신을 함유하며(Kasarda et al. 1976) 반복서열에 많은 글루타민을 가지고 있다(Hisa & Anderson 2001).

ω 5-글리아딘은 밀 의존 운동 유발성 과민증(wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis; WDEIA)의 중심 항원이다. WDEIA는 밀 섭취 후 신체 운동을 할 경우 유발되는 음식 알러지로 민감한 사람에게 발생하며 두드러기와 저혈압과 같은 알러지를 유발하고, 심할 경우 사망에 이르게 한다. 주요 IgE 결합 항원 결정기는 QQIPQQQ와 QQFPQQ이다(Battais et al. 2005, Matsuo et al. 2004, Matsuo et al. 2005, Morita et al. 2003, Palosuo et al. 1999, Palosuo et al. 2001).

본 연구는 알러지 저감 밀 계통을 선발, 동정하기 위해 식량원 육성 밀 반수체 계통 122계통에서 RP-HPLC를 사용 선발하였고, 보다 자세한 분석을 위해 SDS-PAGE, A-PAGE를 이용하여 동정하였다. 이러한 분석법의 정립은 신규 알러지 저감 밀 육성 및 밀 핵심 집단 구축 시 유용하게 사용 될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 재료 DH1-122는 금강과 올그루를 모본, 부분으로 하는 반수체 배가 계통으로 농촌진흥청 국립식량과학원에서 2010년 육성하였으며, 2016년산 밀가루를 분양 받아 사용하였다. 표준품종 Chinese Spring과 CS nullisomic-tetrasomic line (N1AT1B, N1BT1A, N1DT1A, N6AT6B, N6BT6D, N6DT6B)은 일본 밀 유전자원 분양 기관인 National Bioresource Project와 미국 농업연구청(National Plant Germplasm System)에서 분양받아 2016년 증식하여 사용하였다.

글리아딘 추출

SDS-PAGE 분석을 위한 글리아딘 추출은 Dziuba et al. (2014)의 방법을 사용하였다. 비글루텐 단백질을 제거하기 위해 미세하게 분쇄한 밀 100 mg과 0.15 M NaCl 수용액 1 ml를 혼합하여 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후, 15000 × g에서 5분 동안 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 글리아딘을 추출하기 위해 침전물과 70% Ethanol 수용액 1 ml를 혼합하여 상온에서 12시간 동안 반응시키고 15000 × g에서 5분 동안 원심 분리하여 상등액 500 μ l를 취해 동결건조하여 -20℃에 보관하였다.

RP-HPLC 분석을 위한 글리아딘은 밀 100 mg과 70% Ethanol 수용액 1 ml를 혼합하여 하루동안 상온에서 반응시킨 후, 상등액을 centrifugal vacuum evaporator (HT-4X, GeneVac Inc, Ipswich, UK)를 사용하여 건조하고 -20℃에 보관하였다.

A-PAGE 분석을 위한 글리아딘은 밀 100 mg에 60% Ethanol

1 ml을 혼합하여 상온에서 3시간 반응시키고, 14000 × rpm에서 10분 동안 원심 분리 후 상등액을 -20℃에 보관하였다.

RP-HPLC 글리아딘 분획의 프로파일링 및 상대적 발현량 조사

글리아딘 RP-HPLC 분석은 Agilent ZORBAX 300SB-C₁₈ column (5 µm, 4.6 × 250 mm i.d., Agilent Technologies, USA)이 장착된 Waters Alliance e2695(USA)로 분석하였다. 용매 A와 B는 각각 0.1% 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid; TFA)이 포함된 물과, 아세토니트릴(Acetonitrile; ACN)을 사용하였다. -20℃에 보관중인 글리아딘에 sample buffer (0.1%TFA in 20%ACN) 300 µl를 섞어 제조하고 PVDF syringe filter (0.45 µm, Whatman, Maidstone, UK)로 걸러냈다. 단백질을 70분에 걸쳐 용매 B의 25%에서 50%의 선형구배로 용출되었다. 글리아딘의 RP-HPLC 분석은 65℃ 컬럼 온도에서 1 ml/min의 유속으로 수행되었고, 210 nm의 파장에서 모니터링되었다.

크로마토그램의 각 글리아딘 서브유닛별 peaks의 면적(%)은 높이-면적 비법(Height-area method)으로 Waters Empower Pro (USA) 소프트웨어를 이용하여 확인하였고, 이를 두 번 반복해 평균값을 통해 상대적인 발현량을 확인하였다.

Table 1. Chromosomal location and encoding gliadin genes of wheat cultivar ‘Chinese Spring’ and its aneuploid lines missing group 1 and 6 chromosome.

Chromosome	Encoding gliadin genes	Used aneuploid lines
1AS	ω 1, 2-, γ -	N1AT1B
1BS	ω 5-, γ -	N1BT1A
1DS	ω 1, 2-, γ -	N1DT1A
6AS	α β -	N6AT6B
6BS	α β -	N6BT6D
6DS	α β -	N6DT6B

Table 2. Relative expression levels of all gliadin groups in parental (Keumkang and Olgeru) and mutant line (DH5).

Gliadin	Time (min)	Keumkang	Olgeru	DH5
		Area (%)	Area (%)	Area (%)
ω 5-	5-12	7.27	3.05	0.95
albumin	12-18	4.04	6.23	3.22
ω 1, 2-	18-25	6.26	6.34	6.25
α β -	25-38	52.23	57.48	56.64
γ -	38-56	30.20	26.90	32.94
		100	100	100

SDS-PAGE 분석

-20℃에 보관중인 글리아딘에 sample buffer (50 mM Tris-HCl pH6.8, 8% β -mercaptoethanol, 2% SDS, 20% glycerol) 300 µl를 혼합하여 2 µl씩 12.5% mini gel에 70 V로 한 시간, 130 V로 3시간 전기영동을 실시하였다. 로딩이 끝난 젤은 CBB-R250으로 한 시간 염색 후, 3시간 탈색하여 스캐너로 분석하였다.

A-PAGE 분석

12% A-PAGE gel에서 20 mA으로 3시간 pre-running을 실시하였다. 추출한 sample 200 µl을 취하여 loading dye(0.17% Methyl violet in 87% Glycerol) 300 µl와 섞어 제조하였다. 제조된 sample 2 µl를 12% A-PAGE gel에 로딩하여 2시간 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 0.2% CBB R-250, 5% ethanol과 12% trichloroacetic acid으로 overnight 염색하고 tap water에 6시간 동안 탈색하여 형성된 단백질 밴드 패턴을 분석하였다.

결과 및 고찰

RP-HPLC를 이용한 글리아딘 돌연변이 계통의 선발

본 연구는 글리아딘 단백질 일부가 결손된 알려지지 저감 밀 계통을 선발하기 위해 국립식량과학원에서 육성한 반수체 배가 계통 122종의 종자에서 글리아딘 분획을 추출 RP-HPLC 프로파일링 실험을 실시하였다. 본 분석법의 재현성과 정확성을 확인하기 위해 밀 유전·육종 연구의 재료로 활용되는 Chinese Spring (CS)과 각 글리아딘 그룹을 암호화 하는 1번 및 6번의 염색체 일부 또는 전체가 결손된 CS 이수체 계통(CS aneuploid lines, Tables 1, 2)을 사용하여 ω 1, 2-, ω 5-, α β -, γ 글리아딘의 위치 및 결손된 부분을 확인하였다(Fig. 1). 각 크로마토그램에서 5-12분 사이의 peak는 ω 5-글리아딘, 18-25분의 peak는 ω 1,

Fig. 1. RP-HPLC analysis of gliadin proteins from the 'Chinese Spring' group 1 and 6 aneuploid lines. Chromatograms of each aneuploid line are summarized in CS. Peaks corresponding to chromosomes 1A, 1B, 1D, 6A, 6B, and 6D are displayed in red, blue, green, light blue, yellow, and purple arrows, respectively.

2-글리아딘, 25-38분 사이의 α β -글리아딘 그리고 38-56분 사이의 peak는 γ -글리아딘임을 확인하였다(Fig. 1, Table 1). 글리아딘 돌연변이 스크리닝을 위해 부모 계통인 금강, 올그루와 반수체 계통 122종의 글리아딘 RP-HPLC 분석을 실시한 결과, ω 5-글리아딘이 결손 및 저감된 밀 28계통을 확인했고, 이 계통들의 글리아딘은 전반적으로 부모 계통보다 낮은 발현성을 보였음에도 γ -글리아딘 일부는 올그루보다 높은 발현성을 나타냈다(Fig. 2). Fig. 3에 나타난 바와 같이 금강과 올그루, DH5의 크로마토그램을 overlapping 하여 각 글리아딘 서브유닛의 발현량을 비교하였다. 금강의 ω 5-글리아딘은 네 개의 피크로 각각 7.786분, 8.217분, 9.845분 그리고 10.215분에 나타났고, 올그루는 두 개의 피크로 7.786분과 10.215분에 나타났으며, 금강의 네 피크 중 두 개의 같은 피크를 갖는다. ω 5-글리아딘이 저감된 밀 28계통은 금강과 올그루에서 동시에 존재하는 7.786분과 10.215

분 피크가 나타나지 않거나, 발현량이 매우 적었다(Fig. 2). DH5의 γ -글리아딘은 대부분 금강과 올그루보다 발현량이 적게 나타났지만, 47.989분과 48.423분에 나타나는 두 peak만 올그루보다 더 높게 나타났다. 상대적인 발현량을 확인하기 위해 금강, 올그루, DH5에 대한 각 글리아딘 서브유닛별 peaks의 면적(%)을 두 번 반복해 평균값을 나타냈다(Table 2). ω 5-글리아딘은 금강과 올그루에서 각 7.27%와 3.05%를 나타냈지만, DH5에서는 0.95%로 발현이 굉장히 저하 됨을 확인하였다. 반면, γ -글리아딘은 금강과 올그루에서 각 30.20%와 26.90%를 나타냈지만, DH5에서는 32.94%로 글리아딘 서브유닛 중 유일하게 부모계통보다 발현량이 많았다.

ω 5- 글리아딘 저감 계통들의 SDS-PAGE 분석

RP-HPLC를 통해 선별된 28계통의 ω 5-글리아딘의 부분 저

Fig. 2. Profile analysis of gliadin fractions using RP-HPLC in parental (Keumkang and Olgeru) and 122 DH lines. The red dotted box indicates the disappeared peaks.

감을 확인하기 위해 글리아딘을 추출하여 SDS-PAGE를 실시하였다. CS와 CS nullisomic-tetrasomic line (CSNT)을 사용하여 SDS-PAGE상의 45-66.2kDa에 ω 5-글리아딘이 나타남을 확인

하였다. 모본과 부분인 금강과 올그루는 ω 5-글리아딘 부분에 각각 세 개, 두 개의 메이저 밴드로 나타났다. 선발된 28 반수체 배가 계통에서는 모본인 금강에 존재하는 세 개의 메이저 밴드가

Fig. 2. Continued.

전부 발현되지 않았고, 부분인 올그루에 존재하는 두 개의 메이저 밴드 중 먼저 분리된 밴드는 완전히 사라지고 나중에 분리된 밴드만 나타났다(Fig. 4).

ω5- 글리아딘 저감 계통들의 A-PAGE 분석

RP-HPLC실험을 통해 ω5-글리아딘의 발현저하가 확인된 DH line의 28계통과 모본, 부분인 금강, 올그루를 비롯하여 CS

Fig. 3. Overlapping of RP-HPLC chromatograms of gliadins fractions of parental (Keumkang and Olgeru) and DH5 lines.

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of gliadin fractions of CS, CSNT (N1AT1B, N1BT1A, and N1DT1A), Keumkang(K), Olgeru(O) and 28 cultivars of DH line. The red box indicates the disappeared bands.

Fig. 5. A-PAGE analysis of gliadin fractions of CS, CSNT(N1AT1B, N1BT1A, and N1DT1A), Keumkang(K), Olgeru(O) and 28 cultivars of DH line. The yellow, blue, and green dotted box indicate the disappeared bands at N1AT1B, N1BT1A, and N1DT1A compared with the CS. The disappearing bands in the 28 cultivars is shown in red dotted box. On the contrary, the red box indicates the appeared bands.

및 CS 이수체 계통(N1AT1B, N1BT1A, 및 N1DT1A)를 이용하여 A-PAGE를 수행하였다. CS와 ω 5-글리아딘 부분이 null된 N1BT1A를 비교하여 ω 5-글리아딘은 ω 1, 2-글리아딘 2개의 밴드 밑에 2개의 밴드로 존재하며 N1BT1A에서 2개의 밴드 중 1개의 밴드가 결손이 되었다는 것을 확인하였다(Fig. 5). 28계통의 밀가루에서 추출된 글리아딘의 A-PAGE 결과는 모본, 부분인 대조군과 비교하였을 때 ω 5-글리아딘 부분적 결손 및 γ -글리아딘 부분에 모본, 부분에는 없는 밴드가 확인되었다(Fig. 5).

ω 5- 글리아딘 일부 단백질의 감소와 γ - 글리아딘 단백질의 증가

반수체 계통 28종의 RP-HPLC, SDS-PAGE 및 A-PAGE 분석에서 ω 5-글리아딘 일부 단백질이 감소하고 새로운 γ -글리아딘 단백질의 증가하는 현상을 보였다. 이러한 현상은 벼와 밀의 저장 단백질 발현 조절 연구에서 흔히 볼 수 있으며, 한 그룹의 저장 단백질 유전자의 저감 또는 결손이 종종 다른 저장 단백질의 과 발현을 수반 한다는 것을 확인 시켜 준다(Becker et al. 2006). Waga & Skoczowski (2014)의 연구 결과에서도 비슷한 결과가 확인 되었는데, ω 5-글리아딘 일부 단백질이 감소된 계통에서

새로운 저분자 글루테닌 발현을 확인하였다. 비슷한 연구 결과로 RNAi를 이용한 밀 ω 5-글리아딘 유전자의 knock down 실험에서 모든 계통에서 거의 모든 ω 5-글리아딘 단백질이 현저히 감소하였지만 한 계통에서는 3개의 고분자 글루테닌 및 s타입 저분자 글루테닌 단백질이 발현이 저하되었고, s타입 저분자 글루테닌, α β -글리아딘의 일부, 비 글루테닌 단백질인 separin 및 triticin의 발현량이 증가 된 것을 확인하였다(Altenbach et al. 2014). 본 연구팀의 벼 저장단백질의 조절 연구에서도 유사한 연구결과를 확인하였다. 벼 RNAi 기술을 이용한 글루테린, 프롤라민 및 글루블린 유전자의 단일 및 다중 저해 실험에서도 목적 저장단백질의 knock down 효과로 인한 다른 저장 단백질이 보충(compensation)되는 결과를 확인 할 수 있었다(Cho et al. 2016, Kim et al. 2013, Lee et al. 2015).

RP-HPLC에 의한 알리지 저감 밀 스크리닝의 장점

밀은 AA, BB, DD 염색체의 6배체($2n=6x=42$, AABBDD) 및 16Gb의 heterogeneity를 보이고, 아직 유전체 연구도 draft 수준이어서 유전체를 활용한 밀 유전, 육종 연구에 많은 어려움이 있다(Nasuda et al. 2016). 특히 글리아딘 단백질은 1A, 1B, 1D, 6A, 6B, 6D의 locus에 존재하며 품종에 따라 약 100-200의 copy가 있는 것으로 알려져 있고 각 글리아딘 그룹 내의 염기서열 및 아미노산 서열의 차이가 적어 적절한 DNA 마커 개발에 어려움이 많다(Barak et al. 2015). 미국 밀 Butte 86의 이차원전기영동 및 MS/MS에 의한 총 저장 단백질의 단백질 지도 작성 결과를 보면 약 230개의 단백질이 존재하는 것으로 보고 하였다(Dupont et al. 2011). 현재 ω 1, 2-, ω 5-, α β -, γ - 글리아딘 특이(Anderson et al. 2009, Anderson et al. 2001, Kawaura et al. 2005, Matsuo et al. 2005, Noma et al. 2016, Qi et al. 2009, Wang et al. 2017) 및 locus 특이(Wang et al. 2017, Zhang et al. 2003) DNA 마커가 개발 되어 있으나 모든 글리아딘 그룹의 유전자를 대표하지 못하고 개수 또한 많아 많은 수의 밀 계통의 스크리닝(geno-typing)시 효과적이지 못하다. 반면 RP-HPLC에 의한 분석은 모든 ω 1, 2-, ω 5-, α β -, γ - 글리아딘 그룹들을 확인가능하며 높은 재현성과 자동화로 비교적 빠른 시간에 효과적으로 phenotyping 할 수 있는 기술이다. RP-HPLC에 의해 확인된 글리아딘 돌연변이 계통은 SDS-PAGE, A-PAGE, 이차원전기영동 및 MS/MS에 의해 추가 분석이 요구 된다.

적 요

밀 글리아딘 단백질은 밀 글루테닌 단백질의 중요 구성 성분으로 밀 반죽 물성의 점성, 신장성에 영향을 미치며 밀 알러지와 셀리악병 등 밀 관련 질환의 중요한 알러젠으로 작용한다. 이를 해결하고자 주요한 글리아딘 단백질이 결손 된 밀 돌연변이 계통을 찾기 위해 국립식량과학원에서 육성한 밀 반수체 배가 계통 122종에서 글리아딘 분획을 추출 RP-HPLC를 이용하고 글리아딘 프로파일링 실험을 실시하였다. 반수체 122계통의 크로마토그램을 부모 계통과 비교해 본 결과, 28계통에서 오메가-5 글리아딘의 일부 peak가 사라진 것을 확인했다. SDS-PAGE와 A-PAGE 추가 분석에서 부모 계통에서는 오메가-5 글리아딘이 2~3밴드였으나 28계통에서는 하나의 밴드를 보였다. 또한 RP-HPLC를 이용 부모 계통과 돌연변이 계통에서 모든 글리아딘 그룹의 상대적 발현 양을 조사하였다. 본 연구는 많은 밀 유전자원, 육종 계통에서 글리아딘 결손 및 저감 밀을 신속하게 스크리닝하고 동정하기 위한 분석법 확립을 위한 중요한 기초자료로 활용될 것이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ012458) 및 농촌진흥청 차세대바이오그린 21사업(과제번호: PJ013149 및 PJ013159) 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

1. Altenbach SB, Tanaka CK, Allen PV. 2014. Quantitative proteomic analysis of wheat grain proteins reveals differential effects of silencing of omega-5 gliadin genes in transgenic lines. *J Cereal Sci* 59: 118-125.
2. Anderson OD, Gu YQ, Kong X, Lazo GR, Wu J. 2009. The wheat ω -gliadin genes: structure and EST analysis. *Funct Integr Genomics* 9: 397-410.
3. Anderson OD, Hsia CC, Torres V. 2001. The wheat γ -gliadin genes: characterization of ten new sequences and further understanding of γ -gliadin gene family structure. *Theor Appl Genet* 103: 323-330.
4. Anderson OD, Litts JC, Greene FC. 1997. The α -gliadin gene family: 1. Characterization of ten new wheat α -gliadin

- genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and southern analysis of the gene family. *Theor Appl Genet* 95: 50–58.
5. Banc A, Desbat B, Renard D, Popineau Y, Mangavel C, Navailles L. 2009. Exploring the interactions of gliadins with model membranes: Effect of confined geometry and interfaces. *Biopolym* 91: 610–622.
6. Barak S, Mudgil D, Khatkar BS. 2015. Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55: 357–368.
7. Battais F, Courcoux P, Popineau Y, Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Denery-Papini S. 2005. Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *J Cereal Sci* 42:109–117.
8. Becker D, Folck A, Wieser H. 2006. Inhibierung der α -gliadinen expression in hexaploidem Brotweizen. *Getreide technologie* 60: 153–156.
9. Brown JWS, Flavell RB. 1981. Fractionation of wheat gliadin and glutenin subunits by two-dimensional electrophoresis and the role of group 6 and group 2 chromosomes in gliadins synthesis. *Theor Appl Genet* 59: 349–359.
10. Cho K, Lee HJ, Jo YM, Lim SH, Rakwal R, Lee JY, Kim YM. 2016. RNA interference-mediated simultaneous suppression of seed storage proteins in rice grains. *Front Plant Sci* 7: 1624.
11. Cornish SL, Thompson ST, Wieman CE. 2006. Formation of bright matter-wave solitons during the collapse of attractive Bose-Einstein condensates. *Phys Rev Lett* 96: 170401.
12. D'Ovidio R, Masci S. 2004. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J Cereal Sci* 39: 321–339.
13. DuPont FM, Vensel W, Encarnacao T, Chan R, Kasarda DD. 2004. Similarities of omega gliadins from *Triticum urartu* to those encoded on chromosome 1A of hexaploid wheat and evidence for their post-translational processing. *Theor Appl Genet* 108: 1299–1308.
14. Dupont FM, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Altenbach SB. 2011. Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. *Proteome Sci* 9: 10.
15. Dziuba M, Nałecz D, Szerszunowicz I, Waga J. 2014. Proteomic Analysis of Wheat α /A- and β -Gliadins. *Czech J Food Sci* 32: 437–442.
16. Fasano A, Catassi C. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterol* 120: 636–651.
17. Ferranti P, Mamone G, Picariello G, Addeo F. 2007. Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease. *J Mass Spectrom* 42: 1531–1548.
18. Fido RJ, Bekes F, Gras PW, Tatham AS. 1997. Effects of α -, β -, γ - and ω -gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. *J Cereal Sci* 26: 271–277.
19. Forde J, Malpica JM, Halford NG, Shewry PR, Anderson OD, Greene FC, Mifflin BJ. 1985. The nucleotide sequence of a HMW glutenin subunit gene located on chromosome 1A of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Nucleic Acids Res* 13: 6817–6832.
20. Gao S, Gu YQ, Wu J, Coleman-Derr D, Huo N, Crossman C, Jia J, Zuo Q, Ren Z, Anderson OD, Kong X. 2007. Rapid evolution and complex structural organization in genomic regions harboring multiple prolamins genes in the polyploid wheat genome. *Plant Mol Biol* 65: 189–203.
21. Hisa CC, Anderson OD. 2001. Isolation and characterization of wheat ω -gliadin genes. *Theor Appl Genet* 103: 37–44.
22. Johansen BH, Vartdal F, Eriksen JA, Thorsby E, Sollid LM. 1996. Identification of a putative motif for binding of peptides to HLA-DQ2. *Int Immunol* 8: 177–182.
23. Kasarda DD, Autran JC, Lew EJL, Nimmo CC, Shewry PR. 1983. N-terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins: Implications for the evolution of prolamins genes. *Biochim Biophys Acta* 747: 138–150.
24. Kasarda DD, Bernardin JE, Nimmo CC. 1976. Wheat proteins. In *Advances in Cereal Science and Technology*. Ed. Promeranz Y. St. Paul, MN. *Cereal Chem* 1: 158–236.
25. Kawaura K, Mochida K, Ogihara Y. 2005. Expression profile of two storage-protein gene families in hexaploid wheat revealed by large-scale analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol* 139: 1870–1880.
26. Keuning JJ, Pena AS, van Leeuwen A, van Hooff JP, van Rood JJ. 1976. HLA-DW3 associated with coeliac disease. *Lancet* 1: 506–508.
27. Khatkar BS, Fido RJ, Tatham AS, Schofield JD. 2002. Functional properties of wheat gliadins: 1. Effects on mixing characteristics and bread making quality. *J Cereal Sci* 35: 299–306.
28. Kim HJ, Lee JY, Yoon UH, Lim SH, Kim YM. 2013. Effects of reduced prolamins on seed storage protein composition and the nutritional quality of rice. *Int J Mol Sci*, 14: 17073–17084.
29. Lee JY, Lim SH, Kim YM. 2015. Lack of globulin synthesis

- during seed development alters accumulation of seed storage proteins in rice. *Int J Mol Sci*, 16: 14717-14736.
30. Lundin KEA, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. 1993. Gliadin-specific, HLA-DQ($\alpha 1^*0501, \beta 1^*0201$)-restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac-disease patients. *J Exp Med* 178: 187-196.
31. Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Hopfl P, Knip M. 2003. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 348: 2517-2524.
32. Matsuo H, Kohno K, Morita E. 2005. Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Febs J* 272: 4431-4438.
33. Matsuo H, Morita E, Tatham AS, Morimoto K, Horikawa T, Osuna H, Ikezawa Z, Kaneko S, Kohno K, Dekio S. 2004. Identification of the IgE-binding epitope in ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem* 279: 12135-12140.
34. Molberg Ø, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff, Lundin KEA, Sjöström H, Sollid LM. 1998. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nature Med* 4: 713.
35. Morita E, Matsuo H, Mihara S, Morimoto K, Savage AWJ, Tatham AS. 2003. Fast ω -gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 33: 99-104.
36. Nasuda S. 2016. A Review of Wheat Genome Sequencing and Perspectives for Breeding in Post-genome Era. *J JPN SOC FOOD SCI* 63: 480-483.
37. Noma S, Kawaura K, Hayakawa K, Abe C, Tsuge N, Ogihara Y. 2016. Comprehensive molecular characterization of the α/β -gliadin multigene family in hexaploid wheat. *Mol Genet Genomics* 291: 65-77.
38. Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Koivuluhta M, Mikkola J, Keskinen H, Kalkkinen N, Reunala T. 1999. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 103: 912-917.
39. Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H, Reunala T. 2001. Wheat ω -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol* 108:634-638.
40. Payne PI, Holt LM, Law CN. 1981. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *Theor Appl Genet* 60:229-236.
41. 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 Research Institute* 29-35.
42. Payne PI. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annu Rev Plant Physiol* 38: 141-153.
43. Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B, Mariani P, Apollonio I, Gemme G, Mazzilli MC. 1997. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 61: 307-317.
44. Pogna NE, Autran JC, Mellini F, Lafiandra D, Feillet P. 1990. Chromosome 1B encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength. *J Cereal Sci* 11: 15-34.
45. Qi PF, Wei YM, Ouellet T, Chen Q, Tan X, Zheng YL. 2009. The γ -gliadin multigene family in common wheat (*Triticum aestivum*) and its closely related species. *BMC genomics*, 10: 168.
46. Ruiz M, Carrillo JM. 1993. Linkage relationships between prolamins genes on chromosome 1A and chromosome 1B of durum wheat. *Theor Appl Genet* 87: 353-360.
47. Shewry, Peter R, Johnathan A. Napier, Arthur S Tatham. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* 7: 945-956.
48. Singh NK, Shepherd KW. 1988. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. *Theor Appl Genet* 75: 628-641.
49. Sollid LM, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. 2012. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenet* 64: 455-460.
50. Trabace S, Giunta A, Rosso M, Marzorati D, Cascino I, Tettamanti A, Mazzilli MC, Gandini E. 1984. HLA-ABC and DR antigens in celiac disease. A study in a pediatric Italian population. *Vox Sang* 46: 102-106.
51. Tye-Din JA, Stewart JA, Dromey JA, Beissbarth T, van Heel DA, Tatham A, Henderson K, Mannering SI, Gianfrani C, Jewell DP, Hill AVS, McCluskey J, Rossjohn J, Anderson RP. 2010. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med* 2: 41.

52. Waga J, Skoczowski A. 2014. Development and characteristics of ω -gliadin-free wheat genotypes. *Euphytica* 195: 105-116.
53. Wang DW, Li D, Wang J, Zhao Y, Wang Z, Yue G, Liu X, Qin H, Zhang K, Dong L, Wang D. 2017. Genome-wide analysis of complex wheat gliadins, the dominant carriers of celiac disease epitopes. *Sci Rep* 7: 44609.
54. Wasik RJ, Bushuk W. 1975. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel-electrophoresis of reduced glutenin of durum wheats of different spaghetti-making quality. *Cereal Chem* 52: 328-334.
55. Wieser H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 24: 115-119.
56. Wieser H, Kieffer R. 2001. Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a microscale. *J Cereal Sci* 34: 19-27.
57. Wrigley CW, Shepherd KW. 1973. Electrofocusing of grain proteins from wheat genotypes. *Ann N Y Acad Sci* 209: 154-162.
58. Zhang W, Gianibelli MC, Ma W, Rampling L, Gale KR. 2003. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ -gliadin alleles in *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet* 107: 130-138.