

## 벼에서의 아밀로즈 생합성 관련 Wx 단백질의 동정 및 분리

남백희 · 김진구 · 최해춘\*

明知大學校 生物學科, \*농촌 진흥청 작물 시험장

**초록 :** 아밀로즈는  $\alpha$ -1,4 결합으로 이루어진 포도당의 중합체로 곡류에서의 식품학적 기능성을 결정하는 가장 중요한 전분의 구성성분으로, 이의 함량은 단일 우성유전인자인 Wx 유전인자에 의하여 결정된다고 알려지고 있다. 지금까지 Wx 단백질이라고 알려지는 전분 합성 효소(starch-bound starch synthase)는 아밀로즈의 생합성에 관련된 효소로 아밀로즈의 함량을 조절하는 단백질로 알려져 왔다. 따라서 본 연구에서는 아밀로즈의 생합성 기작 연구의 한단계로 Wx 단백질인 아밀로즈 합성 효소를 동정하고 분리하였다. 아밀로즈의 함량이 매우 다양한 변이품종들로부터 전분 결합 단백질을 추출하고 이를 전기영동 분석을 통하여 비교분석하였다. 그 결과 전분과 결합하여 존재하는 66 kDa의 단백질이 전분 중 아밀로즈의 함량과 매우 높은 연관관계를 전기영동상에서 보여주고 있어, 이를 Wx 단백질로 동정하였다. 아울러 이 단백질을 전분으로부터 분리하고, gel filtration 과정을 통하여 순수 분리를 하는 정제 방법을 확립하였다 (1993년 11월 5일 접수, 1993년 11월 26일 수리).

일반적으로 고등식물에서 광합성에 의하여 생성된 포도당으로부터 전분을 합성하는데 관여하는 효소는 glucose kinase(EC 2.4.1.1), phosphoglucomutase(EC 2.7.5.1), UDP glucose-pyrophosphorylase(EC 2.7.7.27), pyrophosphatase(EC 3.6.1.1), starch synthase(EC 2.4.1.21) 등이 지금까지 보고되고 있으며, 이렇게 합성된 아밀로즈를 이용하여 아밀로 펙틴으로 전환되는 데에는 branching enzyme(EC 2.4.1.18) 등이 관련되어 있다.<sup>1)</sup>

아밀로즈와 아밀로펙틴의 구성비율은 벼의 품종에 따라, 또는 재배조건에 따라 다소 차이를 보여주고 있으나, 일반적으로 찰벼(waxy rice; glutinous rice; wx genotype)에서는 아밀로즈가 거의 존재하지 않으며, 우리가 주로 主食으로 이용하고 있는 일반벼인 메벼(nonwaxy rice; Wx genotype)에서는 아밀로즈의 함량이 품종에 따라 전체 전분의 7~30% 에 이르고 있다.<sup>2-4)</sup> 이러한 아밀로즈의 구성 비율은 벼의 품종의 변이에 의하여 결정되는 유전적 요인이 주요 인자로 알려져 왔으며, 여러 관여 유전자들 중에서 Wx 유전자가 가장 중요한 역할을 하고 있다고 알려지고 있다. 일반적으로 쌀에서 알려진 Wx 돌연변이들을 이용한 교배실험 결과 Wx 유전자의 증가효과(gene dosage effect)가 직접적으로 아밀로즈 함량의 증가 효과를 보여 주었으며,<sup>2-3,5-6)</sup> 또한 아밀로즈의 합성에 관여한다고 여겨지는 Wx 단백질의

증가효과에도 직접적으로 관여하고 있음을 보여 주고 있다.<sup>7)</sup> 아울러 이러한 Wx 유전자의 증가 효과(Wx gene dosage effect)는 Indica type의 쌀 품종들에서 Japonica type의 품종에서보다 더욱 현저한 Wx 단백질의 증가 효과를 보여 준다. 이와 같이 서로 독립된 단백질 조절 효과를 보여주는 적어도 2 가지, 즉 Wxa 와 Wxb 로 구분될 수 있는 다른 그룹의 Wx 유전자변이(allele)의 존재 가능성이 제시되기도 하였다.<sup>7-8)</sup> 그러나 한편으로는 이러한 변이들의 교배실험을 통한 후대 분석으로 볼때 Wx 유전자 변이의 작용기작이 cis효과를 보여주는 점을 미루어 보아 조절 유전자에서의 변이(regulatory mutation)에 의한 것으로도 추정할 수 있다.<sup>9)</sup>

또 다른 결과로는 Wx 변이 품종들에서의 Wx 단백질의 양상을 보면, Wx구조유전자의 변이에 의한 불활성화 혹은 변화된 단백질이 생산되기보다는 대부분의 변이품종에 있어서 Wx단백질의 수준이 급격히 감소하였거나 또는 Wx단백질이 전혀 관찰 되지 않는다는 점이다.<sup>7-8)</sup> 따라서 쌀에서의 이러한 Wx변이효과는 Wx 구조 유전자(structural gene)내의 변이에 의한 것이라기보다는 Wx 유전자의 발현에 관여하는 전사(transcription), 전이수준(translational level) 또는 RNA processing 과정 중에 관여하는 인자에서의 변이에 의한 것일 가능성이 더 높다.

본 연구에서는 쌀의 식품학적 기능성에 직접적으로

영향을 주는 가장 주요한 인자로서 아밀로스(amylose)의 생합성에 관여 하는 효소인 Wx 단백질을 추출하여 국내산 찰벼인 Wx 변이 품종들과 아밀로즈 변이 품종들 간의 비교분석을 통하여 동정, 확인하고 이를 분리, 정제하는 방법을 확립하고자 시도되었다.

### 실험재료 및 방법

#### 실험재료

쌀에서의 Wx 단백질의 품종간 차이를 규명하기 위하여 총단백질의 함량 변이와 전분에서의 아밀로즈 함량 변이 및 전분 물성 변이를 보여 주는 대표적인 품종을 선정하여 사용하였다. 본 실험에 주로 사용된 품종과 이들의 일반적인 성질은 Table 1에서 보는 바와 같다. 이들 각 품종의 벼로부터 단백질 및 전분을 효과적으로 추출하기 위하여 현미를 얻은 후 이를 도정하여 10분도 정백미를 얻어 이들을 본 실험의 재료로 사용하였다.

단백질의 표준물질과 gel filtration에 이용된 Suprose 12 column은 Pharmacia 제품을 사용하였으며, sodium dodecyl sulfate(SDS), acrylamide, bis-acrylamide, TE-MED, ammonium persulfate 등은 Sigma 제품을 사용하였으며, 이밖의 일반 시약은 reagent grade의 일본 Junsei 제품을 사용하였다.

Table 1. Amylose and Protein Contents of Various Polished Rice Cultivars used in this Experiment

Cultivar	Ecotype(*)	Amylose(%)	Protein(%)
Hangangchal	I	6.0	8.0
Chucheng	J	16.9	8.2
Jungwon	I	17.8	7.9
Yongju	I	18.0	8.3
Odae	J	19.0	7.7
Chucheong	J	21.2	6.5
Suwon 230	I	23.7	7.9
Suwonjo	J	27.1	8.9
Hanyangjo	I	29.5	8.7
IRAT 177	JV	17.0	7.5
IR 841	I	18.4	8.2
AC 27	JV	25.0	9.5
San Li Cun	JV	26.2	8.9
Chokoto	JV	26.7	9.6
Pusa 33-30	I	27.8	10.0
IR 44	I	28.4	8.2
Chikudu	JV	28.5	8.3
IR 31432	I	32.1	7.2

\*The type J, JV and I describe the japonica, javanica, and indica type rice, respectively.

#### 전분의 분리

전분의 분리는 10분도 정백미를 충분히 분쇄한 후 이를 0.1 M LiOH 알칼리 용액추출 방법을 이용하여 추출하였다.<sup>10)</sup> 추출된 전분은 에틸 알콜로 세척한 후 최종적으로 아세톤 용액으로 다시 세척하여 감압하에서 건조하였으며, 분리된 전분은 상온에서 건조기(dessicator) 내에서 보관하여 사용하였다.

#### 전분 결합 단백질의 분리

벼에서의 전분 생합성에 관련된 효소의 분리를 위하여 전분결합 단백질을 전분으로부터 Sano의 방법<sup>7)</sup>을 변형하여 다음과 같이 추출 분리하였다. 각 품종으로부터 분리된 전분 100 mg을 Eppendorf tube에 넣은 후 쌀의 전 단백질 추출 용액(50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8, 8.0 M urea, 2.0% SDS and 5.0% 2-mercaptoethanol) 1.0 ml를 가하여 이 혼합물을 2분간 vortex하여 15,000 rpm(SM24 rotor, Sorvall refrigerated high speed centrifuge, Dupont)으로 원심분리하여 상등액을 제거하여 배유잔유 단백질을 제거하였다. 배유잔유 단백질이 제거된 전분 침전에 다시 동일한 단백질 추출용액 1.0 ml를 가하여 2분간 끓인 후 이를 15,000 rpm으로 원심 분리하여 상등액을 취하여 전분 결합 단백질을 분리 추출하였다.

#### 단백질의 전기영동

전분 결합 단백질 분포양상의 품종간 변이를 분석하기 위하여 단백질 시료 용액을 전기영동하였다. 전기영동은 10 cm×10 cm의 slab gel(Mighty Small II SE250, Hoeffer Scientific Instrument)기구를 이용하였으며, 이때 사용된 겔의 농도는 12.5%, SDS의 농도는 2.0% 이었으며, 이밖의 gel 조성을 위한 성분의 비율은 Laemmli의 방법<sup>11)</sup>에 따라 조제하였다. 단백질 분리시 시료의 부피는 단백질의 함량에 따라 10~20 ul로 하였으며, 100 v하에 10 C의 냉각수를 순환시켜 냉각하면서 1시간 동안 분리하였다. Gel에서 분리된 단백질은 고정용액(12% trichloroacetic acid, 3.5% sulfosalicylic acid)으로 30 분간 고정된 후 Coomassie Brilliant Blue G- colloidal suspension 용액(0.1% Coomassie brilliant blue G, 2% phosphoric acid, 15% ammonium sulfate)으로 하룻밤 염색하고 탈색용액(10% methanol, 7% acetic acid)으로 탈색한 후 확인하였다. 분자량 측정을 위한 단백질의 표준물질로는 Phosphorylase b(m.w.94 kDa), Bovine serum albumin (67 kDa), Ovalbumin(43 kDa), Carbonic anhydrase(30 kDa), Trypsin inhibitor(20.1 kDa), α-lactalbumin(14.4 kDa)가 포함된 Pharmacia 제품의 standard protein kit를 사용하였다.

**Wx단백질의 순수분리**

전분결합 단백질로부터 Wx 단백질을 순수분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다. 100 mg의 전분으로부터 전분 결합 단백질을 이미 언급한 방법으로 추출하고, 이를 농축하기 위하여 동량의 25% trichloroacetic acid (TCA)을 가하고 30분간 얼음상에 방치하여 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질은 아세톤 용액으로 세척하여 건조하고, 이를 전분결합 단백질 추출 용액에 다시 용해하여 이를 gel filtration chromatography의 시료 용액으로 사용하였다. gel filtration chromatography에 의한 단백질의 분리를 위하여 200  $\mu$ l의 전분 결합 단백질 시료 용액을 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8, 2.0% SDS, 5.0% 2-mercaptoethanol 용액으로 평형된 Suprose 12(Pharmacia) column에 통과시켜 분리하였다. 이때 용액의 유속은 0.5 ml/min이며 Chart 속도는 0.5 cm/min로 고정하였다. Gel column을 통과하여 분리된 단백질 분획은 276 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**전분결합 단백질의 양상**

메벼의 품종(Wx)과 찰벼(wx)의 품종 중 Wx단백질을 동정, 확인하기 위하여 쌀로부터 SDS 존재하에서 전단 단백질을 추출하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분석하여 품종간의 전 단백질 양상을 비교분석하였다. 아밀로즈의 함량이 다른 변이품종들로부터 SDS의 존재하에서 추출한 전 단백질양상을 비교하여 보면 단백질의 분획의 차이를 볼수 없었다(Fig. 1, seed lane B). 그러나 같은 종자로부터 SDS의 존재하에서 끓인 후

추출한 전 단백질양상을 비교하여 보면(Fig. 1, seed Lane A), 68 kDa의 새로운 단백질 분획이 추출됨을 알 수 있었다. 또한 이 단백질은 아미로즈가 전혀 합성되지 않는 한강찰벼와, 매우 낮은 수준의 아밀로즈가 합성되는 추청벼에서는 거의 관찰되지 않은 반면, 아밀로즈의 함량이 매우 높은 수원 230과 IR44 품종에서는 높은 수준으로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 아밀로즈의 함량과 상관관계를 가지는 68 kDa의 단백질은 8 M urea, 2% SDS의 존재하에서 가열한 상태에서만 추출됨을 알 수 있었다.

아밀로즈의 함량과 상관관계를 가지는 68 kDa 단백질은 전단백질 추출 용액으로 단백질을 제거한 후 얻은 쌀 전분으로부터 추출됨을 알 수 있었으며, 또한 이 단백질은 가열하여야만 추출되었다.(Fig. 1, starch lane B). 따라서 아밀로즈의 함량과 상관관계를 가지는 68 kDa 단백질은 전분과 결합된 상태로 존재하는 단백질임을 알 수 있었다.

**전분 결합단백질의 품종간 변이 및 Wx 단백질의 동정**

전분결합 단백질의 추출 시험결과 전단백질의 제거 후에도 Wx단백질로 추정되는 단백질을 포함하는 몇가지의 단백질이 전분과 매우 강하게 결합을 하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 전분결합단백질의 분리를 위하여 전 단백질을 제거한 전분으로부터 전분 결합 단백질을 분리할 수 있었다. 따라서 메벼 및 찰벼로부터 전단백질을 제거한 후, 전분과 결합된 단백질을 추출하고 전분결합 단백질을 품종별로 전기영동하여 전분결합 단백질의 분포 양상을 비교하였다. 단백질을 제

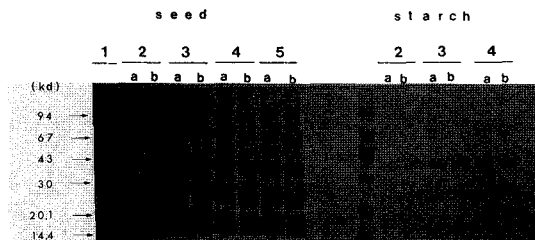


Fig. 1. Electrophoretic pattern of total proteins extracted with (A) and without (B) boiling in the presence of SDS from seed and from starch of various rice cultivars.

The size marker proteins are Phosphorylase b (94 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carbonic anhydrase (30 kDa), Trypsin inhibitor (20.1 kDa), and a-lactoalbumin (14.4 kDa).

1, Size Marker; 2, Hangangchal; 3, Chucheong; 4, Suwon 230; 5, IR44

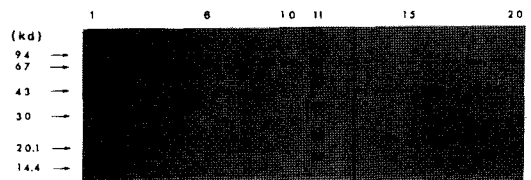


Fig. 2. Electrophoretic pattern of starch-bound proteins in rice Cultivars.

The protein samples from rice cultivars described as follows were run on 12.5% SDS-PAGE. The standard size marker proteins are the same as in Fig 1.

1, Size Marker; 6, Odae; 11, Size Marker; 16, Chokoto. 2, Hangangchal; 7, Chucheong; 12, IRAT 177; 17, Pusa 33-30.

3, Chucheng; 8, Suwon 230; 13, IR 841; 18, IR 44. 4, Jungwon; 9, Suwonjo; 14, AC 27; 19, Chickudu. 5, Yongju; 10, Hanyangjo; 15, San Li Cun; 20, IR 31432.

거한 전분으로부터의 전분결합 단백질의 전기영동분석 결과를 비교하여 보면(Fig. 2) 크게 68 kDa, 35 kDa, 22 kDa, 15 kDa내외의 4가지 종류의 분자량이 다른 단백질이 존재하고 있음을 알수 있었다. 이중 35 kDa, 22 kDa, 15 kDa의 단백질군은 각품종의 아밀로스의 함량과 관련이 없는 잔류된 쌀의 주요 저장 단백질인 glutelin, globulin, prolamin으로 유추되어진다.<sup>12)</sup> 이미 앞에서 언급한 68 kDa의 단백질은 시료 2에서 10번 품종까지의 아밀로스 함량의 증가와 함께 동일한 경향으로 증가함을 알수 있으며, 또한 12번부터 20번 까지의 품종에서도 동일한 경향을 나타내주고 있다. 아밀로스의 함량과의 연관관계에서의 다소 차이를 보여주는 추청벼와 javanica계열의 품종인 AC27, San Li Cun, Chikutu, Chokoto 품종에서의 아밀로스 함량은 HPLC 분석방법에 의한 아밀로스 함량분석결과 요드방법에 의하여 측정된 아밀로스의 함량

보다 낮은 수준을 보여 주고 있어서 본 실험에 의한 Wx 단백질의 발현수준과 일치하는 경향이다(미 발표 결과). 68 kDa의 단백질은 찰벼에서는 나타나지 않으며, 저아밀로스의 품종에서는 적은양, 고 아밀로스 품종에서는 매우 높은 양이 존재하므로 이 단백질의 기능이 아밀로스의 생합성에 관련된 효소 중의 하나인 전분결합 포도당 전이 효소(starch-bound glucosyl transferase), 또는 전분결합 전분 합성 효소(starch-bound starch synthase)인 것으로 유추된다. 이와 같이 Wx protein이라고 추정되는 단백질은 일본쌀에서도 같은 경향을 보여주고, 찰벼에서는 존재하지 않으며 아밀로스의 함량에 비례하여 증가하는 것으로 알려지고 있다.<sup>7-8)</sup> 따라서 본 실험에서 분리된 68 kDa의 전분 결합 단백질은 아밀로스 합성 효소인 것으로 결론지을 수 있었다.

지금까지 보고된바에 의하면 64 kDa과 60 kDa 등 2가지의 분자량이 다른 단백질이 전분결합 전분 합성 효소(starch-bound starch synthase)라고 추정 되어있다.<sup>7-8,13)</sup> 그러나 최근 wx유전자의 분리에 의한 유전자 구조 분석 결과 transit peptide의 분해에 의한 64 kDa의 precursor와 58 kDa의 mature protein의 존재로 유추되고 있다.<sup>14)</sup> 또한 쌀에서의 wx 유전자의 구조 분석 결과를 보면 옥수수,<sup>15-16)</sup> 보리<sup>17)</sup> 등에서 확인된 유전자 염기서열과

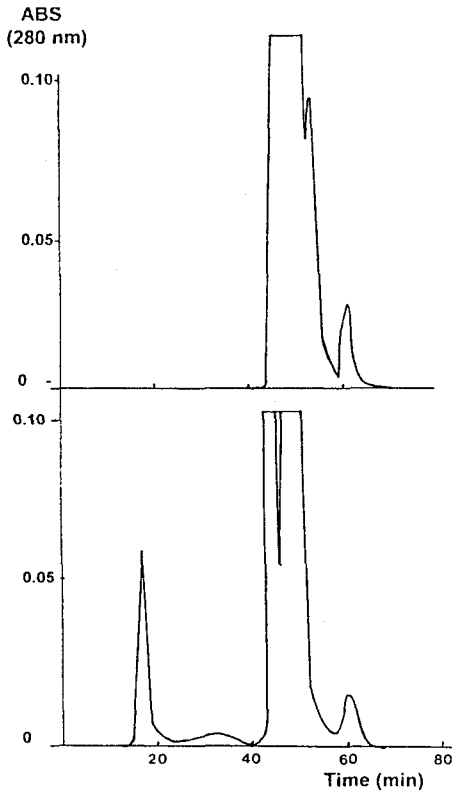


Fig. 3. The elution profile of starch-bound protein extracted from starch on Suprose 12 column. The starch-bound proteins were extracted from (A) Hangangchal wx and (B) Suwonjo cultivar. The running conditions were as follows: Flow rate, 0.25 ml/min; fraction volume, 1.0 ml/fraction; running Buffer, 50 mM phosphate buffer containing 2% SDS.

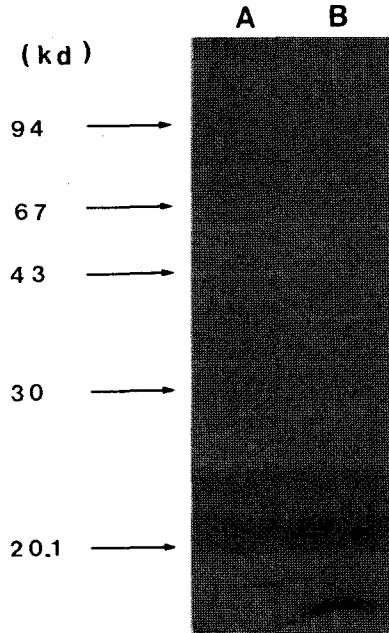


Fig. 4. Electrophoretic pattern of Wx proteins purified by gel filtration with Suprose 12 column. The pooled protein fractions from (A) Suwonjo and (B) Hangangchal were run on 12.5% SDS-PAGE. The standard size marker proteins are the same as in Fig. 1.

이로부터 유추된 아미노산의 서열이 매우 유사한 것으로 확인 되었다. 쌀에서의 wx 유전자의 염기서열에 의한 단백질의 아미노산 서열을 보면 전구단백질이 610개의 아미노산으로 구성되어 있으며 아미노 말단의 78개 아미노산으로 구성된 transit peptide를 가지고 있다. 따라서 성숙된 단백질은 transit peptide가 절단된 532개의 아미노산으로 구성되어 있다고 보고되었다. 그러나 옥수수에서 전분합성에 관여하는 전분합성효소가 soluble 형태와 starch granule bound 형태로 각각 2가지의 분자량이 다른 동위효소로 존재하고 있음을 주시하여 볼때, 본 실험에서 확인된 단백질은 이미 보고된 전분결합 전분합성 효소(starch-bound starch synthase)와는 분자량이 다른 동위효소이거나 또는 전분 결합에 따르는 당단백질일 가능성이 있다.

### 전분 결합 단백질의 순수 분리

아밀로즈의 함량과 상관관계를 가지는 단백질을 효과적으로 추출하기 위하여 추출 실험결과 1차적으로 쌀로부터 전분을 분리하고 이로부터 전분결합 단백질을 분리하는 것이 다량의 전분결합 단백질분리에 매우 효과적임을 알았다. 따라서 전분을 분리한후 이로부터 단백질을 추출한 후 HPLC를 이용한 gel filtration chromatography를 이용하여 순수분리하였다. 68 kDa의 단백질의 순수분리과정은 이미 언급한 바와 같이 전분으로 추출한 전분 결합 단백질의 종류가 매우 제한 되어 있어서 gel filtration chromatography로 용이하게 분리할 수 있었다 (Fig. 3). 68 kDa의 전분결합 단백질분획은 아밀로즈가 없는 한강찰벼에서는 나타나지 않는 반면, 아밀로즈의 함량이 높은 수원조품종에서는 매우 용이하게 단일 Peak를 보여주며, 이 분획의 전기영동 결과 단일 단백질로 순수하게 분리 정제 되었음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 4).

본 실험에서 전분 생합성에 관련될 것으로 유추되는 68 kDa의 분자량을 가진 전분결합 단백질은 아밀로즈 함량에 변이품종별 양상으로 보아 지금까지 통상적으로 wx protein이라고 알려져 온 아밀로즈 생합성에 관련된 효소 중 하나인 전분결합 포도당 전이 효소(starch-bound glucosyl transferase), 또는 전분결합 전분 합성 효소(starch-bound starch synthase)인 것으로 동정되었다, 그러나 이 단백질의 추출이 단백질의 변성조건하에서 이루어져 이 단백질의 직접적인 효소역가를 측정할 수 없었다. 그러나 이러한 어려움은 옥수수에서의 wx 단백질의

동정에 있어서도 마찬가지로 나타났다.<sup>15)</sup> 따라서 본 실험에서도 역가 측정에 의한 효소의 동정은 불가능하였고, 이를 극복하기 위한 방안으로 아밀로즈 함량변이 품종간의 비교분석을 통하여 간접적으로 그 효소를 동정할 수 있었다.

### 감사의 글

이 연구는 1992년도 교육부 학술연구 조성비(遺傳工學)에 의하여 수행되었으며 관계당국에 감사드리는 바이다.

### 참 고 문 헌

1. Beck, E. and Ziegler, P.: Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40 : 95(1989)
2. Williams, V. R., Wu, W. T., Tsai, H. Y., and Bates, H. G.: J. Agr. Food Chem., 6 : 47(1958)
3. Heu, M. H. and Park, S. Z.: Korean J. Breeding, 8 : 48(1976)
4. Heu, M. H. and Park, S. Z.: Seoul Natl. Univ. Coll. Agric. Bull., 1 : 39(1976)
5. Kumar, I and Khush, G. S.: Japan J. Genet., 61 : 559 (1986)
6. Okuno, K.: Japan J. Genet., 53 : 219(1978)
7. Sano, Y.: Theor. Appl. Genet., 68 : 467(1984)
8. Sano, Y., Katsumata, M. and Okuno, K.: Euphytica, 35 : 1(1986)
9. Scandalios, J. G. and Baum, J. A.: Adv. Genet., 21 : 347(1982)
10. Asoka, M., Okuno, K., Sugimoto, Y., Kawakami, J. and Fuwa, H.: Starch, 36 : 189(1984)
11. Lammelli, U. K.: Nature, 227 : 680(1970)
12. 남백희, 강미영, 최해춘: 농촌진흥청 특성과제 연구 보고서(1992)
13. Ogakaki, R. J. and Wessler, S. R.: Genetics, 120 : 1137(1988)
14. Hirano, H and Sano, Y: Plant Cell Physiol. 32 : 989 (1991)
15. Shure, M., Wessler, S. R., and Fedoroff, N.: Cell, 35 : 225(1983)
16. Kloesgen, R. B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z., and Saedler, H.: Mol. Gen. Genet. 203 : 237(1986)
17. Rohde, W., Becker, D. and Salami, F.: Nucleic Acids Res., 16 : 7185(1988)

**Identification and purification of Wx protein involved in biosynthesis of amylose in Rice.**

Baek Hie Nahm, Jinku Kim and Haecheon Choi\* (Department of Biology, MyongJi University, Yongin and \*The Crop Experimental Station, RDA, Suwon)

**Abstract :** The Wx protein, known as starch synthase or starch glucosyl transferase (E.C. 2.4.1.11), is responsible for the amylose synthesis. In an effort to explain the mechanism of amylose biosynthesis, the starch synthase known as Wx protein was identified by analyzing the various wx rice mutants with SDS-PAGE of proteins extracted from rice starch. Finally, the 66kDa protein was purified by extracting the starch-bound protein fractions followed by Suprose 12 gel filtration chromatography.