

## 국/내/외/이/슈

### 프로테오믹스 기술을 이용한 벼 종자의 등속발현 특이 단백질 분석

우선희

(충북대학교 농과대학 식물자원학과)

최종순, 박영목

(한국기초과학지원연구원 프로테오믹스팀)

벼는 옥수수, 밀, 보리와 함께 세계 4대 주요 작물 중의 하나로서 현재 세계 인구의 반 정도가 벼에 의존하고 있다. 따라서 벼 작물에 대한 유전학적, 생리학적, 단백질체학적, 분자학적 특성의 규명과 품질, 생산수량 등의 개선은 인구급증에 따른 부족한 곡물의 안정적 공급과 함께 앞으로 첨예화될 국제 종자전쟁에 대비한 시급한 사안이다. 벼는 단자엽식물의 모델로서 최근 식물 유전체 연구의 발전에 힘입어 많은 변화를 가져왔다. 벼의 게놈 프로젝트에 의하여 북경게놈연구소 및 스위스의 Syngenta 회사에서 인도형 품종 (*Oryza sativa indica*)과 일본형 품종 (*Oryza sativa japonica*)의 전체 게놈 염기서열이 2002년 각각 발표되었으며 또한 일본을 중심으로 진행하고 있는 국제 벼 게놈 프로젝트도 작년 말에 일본형 품종의 게놈 염기서열이 결정되었다. 지금, 벼 연구는 게놈해석을 축으로 기존의 유전육종연구와 분자생물학 및 분자유전학적 연구의 융합과 최근에는 포스트 게놈 연구로서 모든 유전자의 번역산물에 대하여 기능을 해석하는 연구, 즉 프로테오믹스 연구가 추진되고 있다. 특히, 벼 종자의 미질, 내냉성, 다수성, 내병성 품종 개량을 위한 중요 형질관련 유전자의 기능해석에 관한 큰 성과가 있을 것으로 보인다. 본 연구는 “프로테오믹스를 이용한 벼의 유용 유전자 대량 발굴” 과제로서 과기부 작물유전체사업단으로부터 지원 받아 수행해 오고 있는데 연구내용은 최신 프로테오믹스 기술을 이용한 대량으로 벼 종자의 등속별, 층위별로 발현되는 프로테오믹스 패턴을 비교 분석하고 등속과정 특이 유용 유전자를 발굴하여 역유전학적 방법을 이용한 분자유전학적 미질의 특성을 조사하는 것이다.

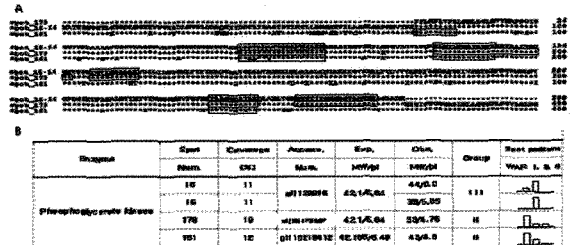


그림 1. 벼 종자의 등속과정중에 나타난 multigene family중의 하나인 phosphoglycerate kinase의 multiple protein alignment (A)와 등속과정 동안의 발현 패턴 (B).

실험재료는 isogenic line의 벼인 일품벼와 수원 464를 이용하여 품종간에 발현되는 단백질 발현양상을 2-DE gel로 비교하였으며 벼의 종자 형성에 관여하는 미량단백질들을 MALDI-TOF MS와 ESI-TOF MS로 분석하였다. 미질에 관계된 유용유전자를 발굴하기 위하여 등속 1주차, 3주차 및 6주차의 완숙종자를 이용하여 2-DE gel 상에서 240개의 단백질 spot을 프로테오믹스 분석 결과 199개의 단백질 spot을 동정하였다 (동정률 82.9%). 이렇게 동정률이 높은 이유는 MS 분석을 위한 on-line automation과 proteome bioinformatics의 분석법 개발에 의한 것이다. 199개의 동정된 단백질 spot들을 분석한 결과 99개의 서로 다른 단백질들을 발견하였다. 이중 39개의 단백질들은 2개에서 10개의 복합체 스팟으로 발견되었다. 특이한 점은 3개 이상의 복합체 단백질들을 보이며 발현되는 단백질 12개중 9개가 전분 생합성을 포함한 탄수화물대사경로에 관여하고 있다는 사실이다. 더욱 흥미로운 것은 이들 9개 단백질들은 multigene family 유전자의 산물이거나 혹은 번역후 수식화 (post-translational modification, PTM)에 의해 나타나고 있다는 사실이다. 현재까지 알려진 바로는 DNA microarray 실험 결과 탄수화물대사경로에 관여하는 86%의 유전자들이 multigene family로 존재한다는 것이 밝혀졌고 ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)의 경우 인산화에 따라 monomer와 dimer로 상호 전환되면서 activity가 없어지는 것이 밝혀지긴 했으나 프로테오믹스를 이용한 등속간 대부분의 탄수화물대사 관련 단백질들이 multigene family로 존재하며 동시에 다양한 PTM 양상이 변화하는

## 국/내/향/이/슈

것은 처음으로 발견된 것이다. 또한, phosphoglycerate kinase의 경우는 등속간에 단백질의 processing이 다양하게 일어나고 있음을 알 수 있었다. 이는 탄수화물 생합성에 관여하는 유전자들이 다양한 multigene family간에 상당히 효율적으로 조절되고 있고 또한 동시에 PTM에 의하여 그 기능이 복잡하게 조절되고 있음을 알 수 있었다 (그림 1).

벼 종자에는 글루테린류 단백질들 (glutelin)이 다량 존재하는데 이러한 고함량 단백질들은 다른 다수의 미량단백질들을 분석하는데 장애가 되고 있다. 발아시 질소원으로 사용되는 glutelin은 벼 종자의 주요 저장단백질로서 총 벼 종자단백질의 약 70%를 차지한다. 종래 전형적으로 이용되고 있는 추출법 (세포용해 완충액 추출법 또는 TCA 추출법)에 의한 추출물을 SDS-PAGE 또는 질량분석기로 분석하면 단백질 중 대부분이 glutelin이다. Glutelin은 합성된 후, highly acidic과 basic 단백질로 분해되는 성질 때문에 LC MS로 분석시 이온화가 너무 잘 되어 nano-LC로 분획한 모든 시료에서 온통 glutelin만으로 동정된다. 벼 종자 시료에서 glutelin 저장단백질을 효율적으로 제거하기 위하여 다양한 방법을 검토하던 중, 순수한 증류수에서 glutelin 저장단백질이 90%이상 제거되는 것을 발견하였다.

완숙한 벼 종자내에서 총위별로 단백질들이 어떻게 달리 발현되는가를 이차원전기영동을 이용 분석하여 160개의 발현 단백질들을 동정하였다. 이 중 90개의 단백질들이 다르게 발현되는 것을 관찰하였고 대부분이 탄수화물대사경로에 관여하는 단백질들이 multigene family로 존재하며 이들 중 다른 총위에서 골고루 다양하게 발현되는 것을 관찰하였다. 이들 단백질 유전자의 promoter들은 총위에 선별적으로 발현하고 싶은 유전자들을 산업적으로 이용될 가능성이 높을 것으로 보인다. 또한 AGPase의 경우 2개의 small subunit와 2개의 large subunit의 단백질들이 발견되는데 그들 중 한 쌍의 small subunit와 large subunit는 종자의 안쪽에서 발현되고 다른 한 쌍의 small subunit와 large subunit는 중간층에서 발현되는 것을 동정하였다. 이것은 AGPase가 앞에서 서

술한 것처럼 multigene family와 PTM에 의하여 조절될 뿐 아니라, 종자의 다른 부위에서 다른 단백질들이 쌓을 이루면서 조절된다는 것을 알 수 있었다. 총위별로 다르게 발현되는 단백질을 프로테옴 분석을 이용하여 시도한 것은 본 연구팀이 처음으로 시도한 것이다.

High fiber mutant인 수원464를 이용하여 Isotope-coded affinity tagging 방법으로 발굴한 23개 단백질과 등속 간에 다르게 발현되는 단백질을 2-D gel을 이용하여 발굴한 45개를 포함한 78개의 미질관련 유용유전자를 이용하여 생체내 기능을 검증하고 있다. 생체내 기능검증은 포항공대의 안진홍 교수팀에서 제작한 T-DNA tagging mutant line을 이용한 스크리닝 방법을 이용하였다. 현재 스크리닝 결과 총 8개의 서로 다른 유전자에 mutation이 일어난 16개의 T-DNA tagging 돌연변이 line들을 확보하였으며 충남대학교 안상락 교수팀의 도움으로 포장에서 현재 T1 식물체를 재배하여 표현형질을 조사하였고 T2 seed를 수확하여 T2 식물체 재배를 올해 계획 중에 있다. 이 중 mutant X (Rab24)등 두 종의 mutant line에서는 노화가 빨리 일어났으며 종자의 수가 현격히 줄어든 것을 관찰하였고 또 다른 유전자 knockout mutant는 잎의 albino 현상과 분얼 (tiller)이 현격히 감소하는 것을 관찰하였다.

본 연구를 통하여 벼 종자의 등속과정에 관련된 프로테옴 분석을 high-throughput display proteomics 방법으로 성공적으로 수행하였으며 벼 종자형성에 관련된 탄수화물대사과정을 조절하는 미량 단백질을 탐색하는데 집중할 것이다. 벼 종자의 등속과정 중에 많은 탄수화물대사 관련 효소단백질들이 multigene family로 존재함으로써 PTM과정이 시공간적 발현 (spatiotemporal expression) 패턴으로 나타나며 이러한 복잡한 process 과정은 종자의 미질형성에 중요한 요소로 작용한다는 사실을 알게 되었다. 앞으로 Cell-map Proteomics 기술을 도입하여 이러한 process에 관련된 조절단백질을 탐색하여 “미질관련 고기능 벼 분자유종체” 개발에 적극 활용할 것이다 [본 내용은 작물유전체 과제 CG1321의 연구결과임].

Korea Genome Organization