

## 벼 등숙기간 중 글루테린 함량 변화에 따른 쌀의 수확적기 판정

신평균 · 장안철<sup>1)</sup> · 홍성창<sup>1)</sup> · 이기상<sup>1)</sup> · 이금희<sup>2)</sup> · 이용복<sup>1)\*</sup>

농촌진흥청 국립원예특작과학원 벼서과, <sup>1)</sup>국립농업과학원 토양비료관리과, <sup>2)</sup>식물검역원 중부격리재배연구소  
(2008년 12월 1일 접수, 2008년 12월 23일 수리)

### Determination of Optimum Rice Harvest Time by Change of the Glutelin Contents During the Maturity Period

Pyung Gyun Shin, Ancheol Chang<sup>1)</sup>, Seong Chang Hong<sup>1)</sup>, Ki Sang Lee<sup>1)</sup>, Keum Hee Lee<sup>2)</sup>, and Yong Bok Lee<sup>1)\*</sup>  
(Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herval Science, <sup>1)</sup>Soil and Fertilizer Management Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, <sup>2)</sup>National Plant Quarantine Service, MAF, Suwon 443-400, Korea)

**ABSTRACT:** The change of glutelin contents in rice grain during the maturity period was investigated to determine optimum rice harvesting time. The glutelin content was increased with increasing time after heading. In this study, eight of glutelin subunits were found. Among the glutelin subunits, 7208-subunit (MW, 35 kD) contents was significantly increased at 65 days after heading compared with 55 and 60 days after heading. 7405-subunit (MW, 50 kD) contents was steadily increased with time after heading. The results showed that at 55th day after heading would be optimum time for harvest to get the low glutelin content of rice grain.

**Key Words:** Harvest time, proteomics, glutelin, glutelin subunits

## 서 론

쌀 수입개방에 대응하기 위한 우리 쌀의 차별화 전략으로 과거의 수량 위주에서 고품질 위주로 품종 육종이 전환되고 있다. 쌀의 품질은 미질에 의해서 좌우되며, 단백질 함량이 낮을수록 미질이 좋은 고품질 쌀로 평가되고 있다. 따라서 탐라이스의 고품질 쌀 기준을 단백질 함량이 6.5% 이하로 설정하고, 이를 달성하기 위한 시비체계 개선에 많은 연구를 수행하고 있다<sup>1)</sup>. 쌀의 저장단백질은 글루테린(70~80%), 프롤라민(10~15%), 글로불린(5~10%) 및 알부민(2~5%) 등으로 구성되어 있다<sup>2,3)</sup>. 그러므로 질소 분석을 통한 총 단백질 함량만으로 쌀의 미질을 차별화 시키는데는 그 한계점을 가지고 있어, 이를 극복하기 위한 분석기법 도입이 필요할 것으로 판단된다. 환경변화에 따른 유전발현의 최종 산물인 단백질의 발현 후 변형, 기능 및 조절작용, 다른 단백질과의 상호작용 등을 세포 내 분자수준에서 해석하는데 Proteomics 기법

이 널리 이용되고 있다<sup>4-8)</sup>. 그리고 쌀 저장 단백질의 종류 및 변형을 연구하는데도 널리 이용되고 있다. 예를 들면, 일본에서는 쌀의 차별화 전략으로 Proteomics 기법을 이용해서 글루테린 함량이 낮은 쌀을 개발하여 백화점에서 최고가로 판매되고 있다<sup>9,10)</sup>.

본 연구는 추청벼를 대상으로 출수 후 등숙 기간에 따른 글루테린 함량 변화를 Proteomics 기법으로 분석하여 고품질 쌀 생산을 위한 수확적기 결정에 이용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재배방법 및 시료조제

벼 재배시험은 2005년 경기도 화성시 향남면 제암리에서 수행하였고, 시험품종은 추청벼로서 모온절충 못자리에 4월 중순 파종하여 40일정도 육묘하여 재식거리 30x15 cm로 5월 19일 손이앙 하였다. 총 질소시비량은 70 kg ha<sup>-1</sup>로 시비하였고, 56-22-22% 비율로 분시하였다. 인산 및 칼리는 45, 57 kg ha<sup>-1</sup>로 시비하였다. 시료채취 시기는 추청벼의 수확적기인 출수 후 경과일수 60일 전후 5일 간격으로 채취하였다. 수확한 벼를 탈곡하여 수분함량 14~15% 정도로 건조하여

\*연락처:

Tel: +82-31-290-0321 Fax: +82-31-290-0208  
E-mail: soiltest@kg21.net

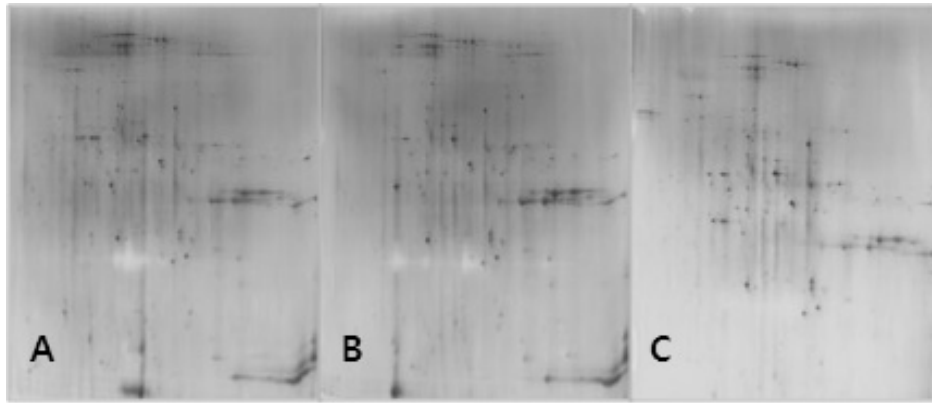


Fig. 1. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins in the developing rice endosperm. A: 55 days after heading, B: 60 days after heading, C: 65 days after heading.

실험실용현미기(TR200, Kett Co. Japan)로 벼의 껍질을 벗긴 후 실험실용백미기(PEARLEST, Kett Co. Japan.)로 백미를 추출하여 배유에 해당하는 부분만 반으로 잘라 시료분쇄기(실험실용 밀(TQ-100), Kett Co. Japan)로 분쇄한 다음 표준용 체 (5  $\mu$ m)로 친 쌀가루를 시료로 사용하였다.

#### 단백질체 분석

쌀가루는 10배 부피의 7 M urea, 2 M Thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) dithiothreitol (DTT), 2% (v/v) pharmalyte, 1 mM benzamidine로 구성된 시료용액과 혼합되어 homogenizer (PowerGen125, Fisher Scientific)에 의해 분해되었다. 그리고, 단백질 추출을 위해서 1시간 동안 vortexing 하였으며, 15°C에서 15,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 이차원전기영동의 시료로 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 Bradford법<sup>11)</sup>으로 수행하였다.

일차 Isoelectric focusing (IEF)는 Amersham Biosciences사의 Multiphore II system을 이용하여 제조회사의 사용 매뉴얼을 준수하여 20°C에서 IEF를 수행하였다. 이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 위해 Ettan DALT 2D system (Amersham Biosciences)을 이용하여 이차원전기영동을 하였다. 완료된 이차원 젤의 단백질은 Anderson 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 Coomassie G250으로 시각화하였다.

염색된 이차원 젤은 AGFA사의 Duoscan T1200 스캐너로 스캐닝하여 PDQuest software (version 7.0, BioRad)를 이용하여 각 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 평균화(normalization)되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현변화를 보여주는 단백질 spots을 선정하였다.

단백질 spots은 Shevchenko 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해하여 Ettan MALDI-TOF(Amersham Biosciences)로 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 서열 분석 후 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 PepFrag 검색엔진을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 출수 후 경과일수별 글루테린 패턴 변화

출수 후 경과일수별 저장단백질의 변화를 분석하기 위해 추청벼를 이용하여 이차원 전기영동을 Fig. 1과 같이 2-D 젤에서 122개의 단백질 spots를 분리하였다. 이 중에서 저장단백질 변동을 보여주는 26개의 단백질을 MALDI-TOF/MS로 Table 1과 같이 동정하였다. 동정된 26개 단백질 중에서 글루테린 단백질을 영상분석한 결과 Table 2와 같이 8개의 글루테린 소단위체가 동정되었다. 전체 글루테린 함량은 출수 후 경과일수가 증가할 수록 증가 되었다. 이는 Yamagata<sup>14)</sup> 및 Li 등<sup>2)</sup>이 발표한 종자가 발달되면서 글루테린 함량이 일정하게 증가한다는 내용과 일치한다. 현재 추청벼의 수확적기는 출수 후 60일로 권장하고 있으나, 수확을 5일 정도 빨리 하므로써 글루테린 함량이 낮은 쌀을 생산할 수 있을 것으로 예측된다.

출수 후 경과 일수에 따른 글루테린 소단위체의 함량변화는 상이하게 나타났다. 특히, 분자량 35.1 kD(Spot ID, 7208)인 글루테린 단위체의 함량은 출수 후 55일과 60일 사이에는 큰 차이가 없었지만, 65일에 급격히 증가하는 특징을 보였다. 그리고 분자량 50 kD(Spot ID,7405)인 글루테린 단위체의 함량은 출수 후 55, 60, 65일에서 각각 196, 839, 1680으로 출수 후 경과일수에 따라 일정한 증가율을 보였다. 따라서 분자량 50 kD(Spot ID,7405)인 글루테린 단위체는 출수 후 수확시기를 판별할 수 있는 지표로 활용가능이 있는 것으로 생각된다.

### 인용문헌

- Chae, J.C. (2002) Present status prospect of crop production technology to improve the crop quality and functionality, *Korean J. Crop Sci.* 47(S), 1-14.
- Li, X., and Okita, T.W. (1993) Accumulation of

**Table 1. Proteins identified in rice endosperm by MALDI-TOF/MS**

Spot ID	MW (kD)	pI	Protein identification	Accession No.
5108	21.59	5.41	Alpha-globulin	AAT93857
5309	48.78	5.59	Retrotransposable element	AAN11185
5402	56.36	5.43	Poly(A) polymerase	XP_464757
5415	50.79	5.48	Hypothetical protein	AAQ56312
5416	47.82	5.44	Glucosyltransferase-3	XP_478348
5523	57.40	5.42	OSJNBa0079C19.27	CAE54568
6311	39.68	5.64	GTP-binding protein	AAP37780
6411	49.97	6.37	Sorbitol dehydrogenase	XP_483619
6412	49.97	6.17	Unknown protein	XP_479212
6413	48.18	5.68	Glutelin precursor	1210248A
6414	53.78	5.65	Glutelin type I precursor	XP_463450
7113	21.71	7.42	Glutelin	1311273A
7114	18.00	7.51	Glutelin 2 precursor	B34332
7115	17.31	7.50	Glutelin	AAA50317
7208	35.01	7.20	Glutelin	XP_465431
7212	34.18	7.81	OSJNBa0033G16.8	CAD40926
7302	48.90	6.67	Glutelin	1404367A
7308	37.26	7.36	Sorbitol dehydrogenase	XP_483619
7402	50.45	6.61	Formate dehydrogenase	Q9SXP2
7404	50.54	7.30	Sorbitol dehydrogenase	XP_483619
7405	50.16	6.71	Glutelin	CAA38211
7408	51.31	7.17	Glutelin	AAA50317
7409	50.72	6.89	Sorbitol dehydrogenase	XP_483619
7410	50.06	6.49	Sorbitol dehydrogenase	XP_483619
8302	37.54	7.99	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	XP_466582
8403	47.90	7.93	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	XP_466582

**Table 2. Glutelin subunits quantities in the developing rice endosperm**

Spot ID	MW (kD)	pI	Identification name	Protein spots quantity		
				55 DAH*	60 DAH	65 DAH
6413	48.18	5.68	Glutelin precursor	-	119	-
6414	53.78	5.65	Glutelin type I precursor	-	-	248
7113	21.71	7.42	Glutelin	645	915	255
7114	18.00	7.51	Glutelin 2 precursor	163	232	75
7208	35.01	7.20	Glutelin	936	983	3550
7302	48.90	6.67	Glutelin	353	557	265
7405	50.16	6.71	Glutelin	196	839	1680
7408	51.31	7.17	Glutelin	-	243	94
Total				2320	3888	6167

\* DAH, days after heading

- prolamins and glutelins during rice seed development: a quantitative evaluation, *Plant Cell Physiol.* 34, 385.
- Tanaka, N., Mitsui, S., Hiroya, H., Yanagi, K., and Komatsu, S. (2005) Expression and function of proteins during development of the basal region in rice seedling, *Mole Cell Proteomics* 4.6, 796-808.
  - Komatsu, S., Kajiwara, H., and Hirano, H. (1993) A rice protein library: a data-file of rice proteins separated by two-dimensional electrophoresis, *Theor. Appl. Genet.* 86, 935-942.
  - Komatsu, S., Konish, H., Shen, S., and Yang, G. (2003) Rice proteomics. A step toward functional

- analysis of the rice genome, *Mole Cell Proteomics* 2.1, 2-10.
6. Komatsu, S., Kojima, K., Suzuki, K., Ozaki, K., and Higo, K. (2004) Rice proteome database based on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: its status in 2003, *Nucleic Acids Research* 32, D389-D392.
  7. Koller, A., Washburn, M. P., Lange, B. M., Andon, N. L., Deciu, C., Haynes, P. A., Hays, L., Schieltz, D., Ulaszek, R., Wei, J., Wolters, D., and Yaster III, J. R. Y. (2002) Proteomic survey of metabolic pathways in rice. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.172183199](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.172183199):1-6.
  8. Park, O. K. (2004) Proteomic studies in plants, *J. Biochem. Molecular Biol.* 37(1), 133-138.
  9. Kusuba, M., Miyahara, K., Iida, S., Fukuoka, H., Takano, T., Sassa, H., Nishimura, M., and Nishio, T. (2003) *Low glutelin content1*: A dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice, *The Plant Cell* 15, 1455-1467.
  10. Nishimura, M., Kusaba, M., Miyahara, K., Nishio, T., Iida, S., Imbe, T., and Sato, H. (2005) New rice varieties with low levels of easy-to-digest protein, 'LGC-Katsu' and 'LGC-Jun', *Breeding Science* 55, 103-105.
  11. Bradford, M. M. (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.
  12. Anderson, N.L., Esquer-Blasco, R., Hofmann, J.P., and Anderson, N.G., (1991) A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies, *Electrophoresis* 12(11), 907-30.
  13. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68, 850-858
  14. Yamagata, H, Sugimoto, T., Tanaka K., and Kasai. Z. (1982) Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds, *Plant Physiol.* 70, 1094-1100.
-