

벼 종자 저장단백질 및 재설계 연구 동향

김영미 · 이종렬 · 윤웅한 · 최상봉 · 하선화 · 임선형

New design of rice seed storage proteins

Young-Mi Kim · Jong-Yeol Lee · Ung-Han Yoon · Sang-Bong Choi · Sun-Hwa Ha · Sun-Hyung Lim

Received: 25 October 2011 / Accepted: 7 November 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Rice is one of the most important food crops since it is consumed by approximately 60% of the world's population. The most abundant component of rice grain is starch that is an important source of energy. The second abundant component is protein, which is an important protein source for people in many developing countries that rarely take animal protein. However, the rice protein lacks the essential amino acid lysine. Therefore, nutritional improvement in the essential amino acid composition of rice proteins is required. On the other side, rice grain has attracted attention as a diet and health food in developed countries, because its proteins have superior physiological and food processing properties. Thus, nutritional improvements in rice seed proteins by changing amino acid composition or introducing an useful protein or peptide have been studied. This review aims at assessing the current research status of biosynthesis, accumulation, genetic improvement of seed storage proteins by mutation or genetic engineering in rice.

서론

식물종자의 저장물질은 등숙기에 저장기관내 집적되며 집적기관은 콩은 자엽, 곡류는 배유로 생물종에 따라 다

르다. 또한 종자의 저장물질은 단백질, 전분, 지질 등으로 이들의 함량비 역시 생물종에 따라 다르며 종자단백질의 함량비는 콩과류가 20~40%로 높고, 곡류는 10~12%로 비교적 낮다 (Shewry and Halford 2002). 종자단백질은 종자 발아과정에서 초기생육에 필요한 질소 성분을 저장하는 기능을 갖고 있으며 종자단백질 중 등숙과정에 배유에서 합성, 집적되는 중요한 단백질이 종자의 저장단백질로 배유에서 합성될 때 단백질과립 (protein body, PB)에 집적된다. 이후 배유조직은 탈수과정을 거치며 휴면상태에 들어가게 되는데 이때 단백질과립은 단백질 분해로부터 보호된다. 종자 발아시 종자가 물을 흡수하게 되면 배나 호분층에서 프로테아제가 합성, 분비되어 배유 중의 저장단백질을 분해하고 유식물 조직 성장에 필요한 질소 원으로 이용된다. 일반적으로 곡류에서 주요 저장단백질은 프롤라민으로 이는 고전적인 용매 분획에 따른 분류 방법에 준하여 명명된 것으로, 수용성단백질인 알부민, 염기성단백질인 글로부린을 추출한 후 알콜용액에 의해 추출되는 단백질을 총칭한다 (Osborn 1924). 글루테린이 주단백질인 벼와 글로부린이 주단백질인 귀리를 제외한 보리, 밀, 옥수수 등 대부분의 곡류 종자 저장단백질의 주단백질은 프롤라민계열이다 (Bewley and Black 1985). 벼와 귀리는 보리나 옥수수와 다른 특유의 저장단백질 합성 및 집적기구가 존재하며, 벼의 프롤라민은 옥수수의 제인(zein)과 유사한 기구에 의해 합성되어 소포체 유래의 단백질과립-I에 집적된다. 반면에 벼의 글루테린은 소포체에서 합성된 후 골지체를 경유하여 저장액포로 수송되어 액포형 단백질과립-II을 형성한다. 이와 같이 저장단백질은 동일한 배유조직에서 같은 시기에 합성과 집적이 진행되지만 합성경로와 집적부위를 서로 다르다 (Yamagata et al. 1982).

벼의 종자 저장단백질은 통상 정백미 중량의 5~7%를 차지하며 이 단백질의 양과 질은 품종에 따라 다양하고

Y.-M. Kim (✉) · J.-Y. Lee · U.-H. Yoon · S.-H. Ha · S.-H. Lim
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부
(Department of Agricultural Bio-resources, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea)
e-mail: ymikim@korea.kr

S.-B. Choi
명지대학교 생명과학정보학부
(Division of Bioscience and Bioinformatics, Myongji University, Yongin, Korea)

취반시 식미나 가공적성에 큰 영향을 미친다 (Furukawa et al. 2006). 벼 종자의 저장단백질의 합성과 집적에 관한 분자기구가 최근 분자생물학적 연구를 통하여 밝혀지고 있으나 실제 이러한 분자기구와 취반시의 식미, 양조적성, 가공식품 특성과의 관련성에 대하여 불분명한 점이 많다. 벼 종자저장단백질의 합성과 집적에 관한 분자기구의 해석은 고품질 벼의 재배기술이나 가공적성이 우수한 벼 품종 육성이라는 실용적인 기술개발에 기여할 것으로 생각된다.

벼 종자 저장단백질의 생합성과 축적

벼 종자 저장단백질의 특징과 분류

벼 염색체 해독이 완료된 후 3만여 개의 벼 유전자의 구조 및 기능이 밝혀지고 있으며 저장단백질에 대한 유전자구조분석도 수행되어 왔다 (Kim and Okita 1988; Masumura et al. 1989a; Masumura et al. 1989b; Masumura et al. 1990; Mitsugawa et al. 1998; Mitsugawa et al. 1999; Okita et al. 1989; Takaiwa and Oono 1991; Takaiwa et al. 1996; Katsube-Tanaka et al. 2004; Yoon et al. 2011). 벼에서 전체 저장단백질의 60~80%를 차지하는 글루텔린은 15개의 유전자에 의해, 20~30%를 차지하는 프롤라민은 34개의 유전자에 의해 암호화되어 있다 (Kawakatsu et al. 2008; Xu and Messing 2009; Yoon et al. 2011). 글루텔린 유전자는 아미노산의 상동성에 따라 GluA, GluB, GluC, GluD의 네 개의 그룹으로 분류될 수 있고, 프롤라민은 SDS-PAGE 전기영동상의 이동성에 따라 10-kD, 13-kD, 16-kD 프롤라민의 세 그룹으로 분류된다 (Kawakatsu et al. 2008). 특히 13-kD 프롤라민은 각각의 유전자 염기서열정보와 종자에 존재하는 단백질 중 상응하는 단백질의 분석에 어려운 점이 있어 시스테인 잔기수에 따라 세 개의 썬브그룹으로 세분화하며 (Table 1), 시스테인 잔기는 프롤라민 폴리펩티드의 분자내 결합을 형성함과 동시에 분자간 결합에도 관여하여 단백질과립-I 형성에 큰 영향을 미치는 것으로

알려져 있다 (Muench et al. 1999). 아미노산 서열의 상동성 비교로 16-kD 과 13-kD 프롤라민은 옥수수 γ -zein, 10-kD 프롤라민은 δ -zein과 유사한 단백질로 분석되었다 (Xu and Messing 2009).

글루텔린과 프롤라민 합성 및 집적 분자기구

벼 종자 저장단백질은 동일한 배유세포내에서 등숙기에 다량 합성된다. 그러나 이들 저장단백질은 세포내 존재하는 2종류의 단백질과립에 명확하게 분배되어 프롤라민은 단백질과립-I에, 글루텔린과 글로부린은 단백질과립-II에 각각 집적된다. 이와 같이 같은 시기에 같은 세포내의 조면소포체상에서 합성이 진행되지만 최종적으로 집적되는 장소가 서로 다르게 되는 세포내의 선별기구에 대해서는 많은 연구가 진행되어 왔으며 이 기구를 유전공학적으로 응용하면 용도에 따라 2종류의 단백질과립에 외래단백질을 분배 집적 가능할 것으로 생각된다.

지금까지 해명된 단백질과립 형성 기구를 정리하자면 프롤라민은 조면소포체 (rER) 유래의 막계인 단백질과립소포체 (PB-ER) 상에서 프롤라민 전구체로 번역되어 PB-ER 내강(內腔, lumen)에 진입할 때 시그널 펩티드가 제거되고 성숙형 프롤라민이 되어 단백질과립을 형성한다. 한편 글루텔린은 PB-ER과는 다른 막계인 활면소포체 (cisternal ER; c-ER) 상에서 글루텔린 전구체 (proglutelin)로 번역된 후, c-ER 내강으로 진입시 시그널펩티드가 제거되고 글루텔린전구체 (glutelin precursor)가 된다. 이후 c-ER로부터 수송소포가 생겨 골지체로 글루텔린 전구체를 수송하고 다시 골지체 유래의 수송소포에 의해 단백질저장액포 (protein storage vacuole, PSV)로 운반된다. 글루텔린 전구체는 PSV 내부에서 효소에 의해 산성과 염기성 서브유닛으로 절단되어 각 서브유닛끼리 결합하여 고분자화되어 단백질과립-II를 형성한다 (Fig. 1).

저장단백질의 수송기구가 효율적으로 진행되기 위해서는 적절한 시기에 배유 세포내 저장단백질 유전자의 강한 발현도 필요하지만 동시에 생합성된 단백질이 특정 단백질과립에 정확하게 분배될 필요가 있다. 이를 위해

Table 1 Classification of characteristics of prolamins in rice

| Groups | Numbers of Cys | Numbers of gene copy | Chromosome No. |
|-----------------|----------------|----------------------|----------------|
| 13-kD prolamins | | | |
| 13-I | 4 | 2 | 7 |
| 13-IIa | 0 | 18 | 5 |
| 13-II | 0 | 4 | 70 |
| 13-III | 7-8 | 4 | 12 |
| 10-kD prolamins | 10 | 4 | 3, 11 |
| 16-kD prolamins | 12 | 4 | 6 |

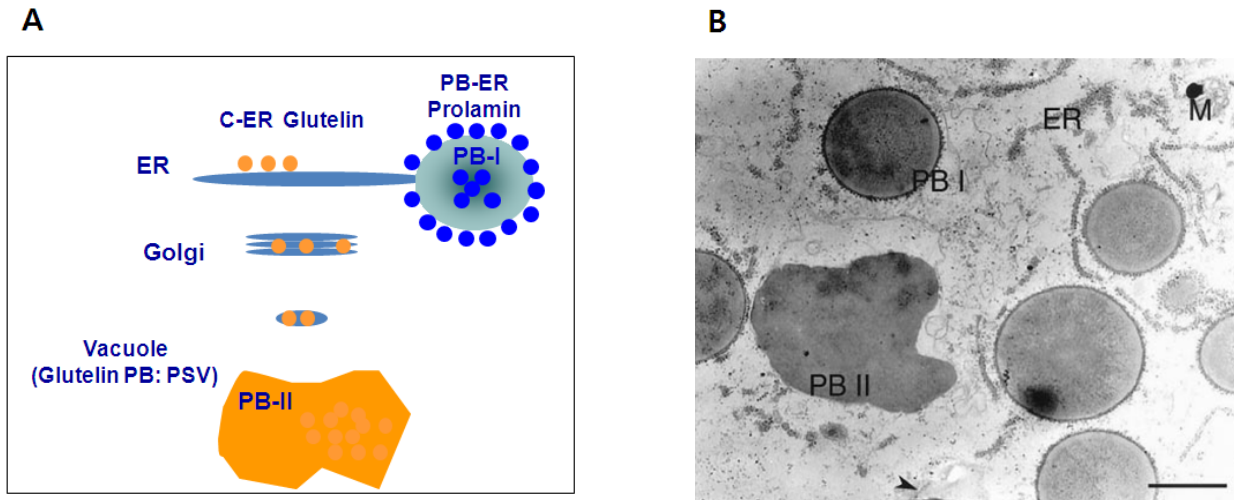


Fig. 1 Synthesis and deposition of storage proteins in rice endosperm. **A.** Accumulation pathway of storage proteins in rice endosperm cells. Glutelin and globulin are synthesized at cisternal endosperm reticulum (C-ER) on rough ER and transported co-translationally into the lumen and pass via Golgi apparatus into protein storage vacuoles (PSVs, PB-II). Prolamin mRNA is translated at protein body-forming ER (PB-ER). Prolamins are accumulated directly to PB-ER (PB-I) within the lumen of the rough ER. **B.** Electron microscopic image of protein bodies in developing endosperm (Taken from Takemoto et al. 2002, copyrighted by the American Society of Plant Biologists, with permission). The prolamin-containing PB-I is spherical, with a low electron density structure (diameter 1-2 μm) surrounded by an ER-origin membrane. The glutelin and globulin-containing PB-II is amorphous, with a electron-dense structure (diameter 2-4 μm). M, mitochondria; bar = 1 μm .

각 저장단백질의 선택적 수송시그널과 각각의 시그널에 대응하는 세포내막수송계의 막수용체 (receptor)가 특이적으로 상호 인식할 필요가 있다. 등숙과정에 발현되는 유전자의 전체적인 분석을 통해 저장단백질 합성과 수송에 관한 유전자 발현양상 등을 비교함으로써 상호작용에 관여하는 인자를 탐색하는 연구도 시작되어 금후 진전이 기대된다 (Suzuki et al. 2005).

벼 종자 저장단백질 집적의 유전적 제어기구

프롤라민 집적 제어기구

벼 프롤라민은 시스테인이 풍부한 프롤라민 (Cys-R 프롤라민: 10-kD, 13-kD, 16-kD)과 시스테인을 함유하지 않는 프롤라민 (Cys-P 프롤라민: 13-kD)으로 구성되어 Cys-R 프롤라민이 전체 프롤라민의 약 60%를 차지한다 (Ogawa et al. 1987). 벼 프롤라민은 소포체내강에 S-S결합으로 응집되어 구형의 단백질 과립-I를 형성하고 있다 (Bechtel and Juliano, 1980). 발현분석에 의해 먼저 Cys-R의 10-kD 프롤라민이 소포체내강에 집적되고 단백질과립-I의 중심부에 집적되고, 이어서 Cys-P 프롤라민이 주위를 둘러싸고 집적됨이 밝혀져 있다. 프롤라민 돌연변이체를 이용한 연구 결과로 부터도 Cys-R 프롤라민이 PB-I의 구형성에 중요하다는 것이 시사되었다 (Ogawa et al. 1989). 벼의 배유는 소포체내강에 분자 샤페론인 BiP가 다량 함유되

어 있고 BiP는 신생프롤라민 폴리펩티드와 성숙형 프롤라민 폴리펩티드 및 단백질 과립-I에 결합되어 있다 (Li et al. 1993). BiP는 소포체에 균일하게 분포되어 있지 않고 프롤라민 PB 주변부에 위치하며 번역후의 프롤라민은 소포체 내강에 삽입된 후 BiP가 결합, ER 내강으로 효율적으로 집적하여 단백질 과립을 형성하는 것으로 생각된다 (Muench et al. 1997). 벼 프롤라민 mRNA는 세포내 균일하게 분포하지 않고 PB-ER에, 글루텔린 mRNA는 cis-ER에 존재함이 밝혀졌다 (Li et al. 1993b; Choi et al. 2001). 또한 프롤라민 번역영역과 3'말단 비번역영역 (3' UTR)이 프롤라민 mRNA의 PB-ER로의 타깃팅에 필수적임이 시사되었다 (Hamada et al. 2003). 벼 프롤라민 mRNA는 PB-ER에 특이적으로 존재하게 되고 그 PB-ER상에서 바로 번역과정으로 진행되어 프롤라민 단백질의 효율적인 농축이 이루어진다고 생각된다.

글루텔린 집적 제어기구

글루텔린은 40 kD의 산성 서브유닛과 20 kD의 염기성 서브유닛으로 구성되어 양 서브유닛이 S-S 결합을 통해 회합분자를 형성한다. 또한 글루텔린은 6량체를 형성하여 PB-II내 축적된다. 글루텔린은 폴리솜이 결합한 조면소포체상에서 57kD의 전구체로 합성된 후 골지체를 경유하여 저장형액포로 수송된다. 이후 상기 2종의 서브유닛으로 절단된 후 PB-II내 축적된다 (Yamagata et al. 1982b). 글루텔린의 합성부터 축적까지의 과정에서 프롤라민 RNA

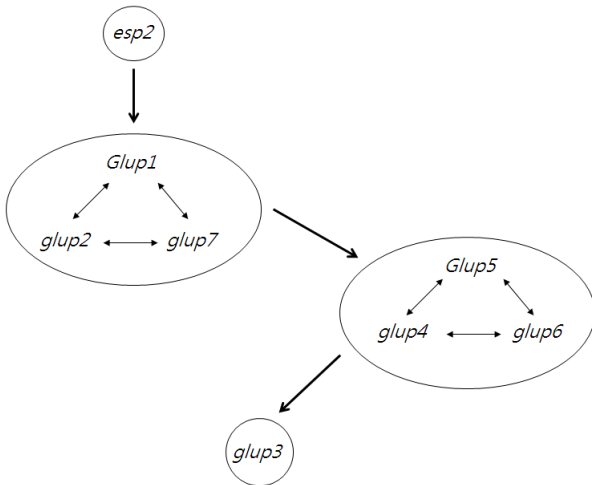


Fig. 2 Genetic relationship among the proglutelin mutants (Ueda et al. 2010). The *esp2* is structural gene for endosperm-specific protein disulfide like (PDI) and participates in the maturation of proglutelin. *Glup1-glup2-glup7* mutants and *glup4-glup6-Glup5* mutants participate in the intracellular trafficking of proglutelin from the ER to Golgi apparatus and from the Golgi apparatus to the PSV, respectively. The *glup3* encodes a vacuolar processing enzyme, which proteolytically processes proglutelin into acidic and basic subunits within the PSV.

와 같은 표적수송과 분자사폐론에 의한 효율적인 집적기구의 존재는 거의 밝혀져 있지 않다. 그러나 글루텔린 전구체로 합성되어 내막계 (endomembrane system)를 경유한 PB-II에 수송되고 집적되는 복잡한 경로는 프롤라민의 합성 및 집적 경로와는 다른 유전적 제어를 받는 것으로 생각된다.

글루텔린의 수송부터 집적까지의 과정에서 유전적 제어 기구를 규명하기 위해 글루텔린 전구체를 집적하는 8 계통의 돌연변이 *esp2*, *Glup1*, *glup2*, *glup3*, *glup4*, *Glup5*, *glup6*, *glup7*을 동정함으로써 수송과정 단계와 관련한 유전자의 위치가 밝혀져 figure 2에 명시하였다. 소포체내 분별수송에 관여하는 유전자 변이로 *esp2*, 소포체로부터 수송소포형성에 관여하는 유전자 변이로 *glup1-glup2-glup7*, 소포체로부터 액포까지의 수송에 관여하는 유전자 변이로 *glup4-Glup5-glup6*, 액포내 프로세싱에 관여하는 유전자 변이로 *glup3*로 분류되었다. 이들 결과로부터 *esp2* 변이가 가장 상위에 존재하며 *glup1-glup2-glup7* 변이는 *glup4-Glup5-glup6*과 *glup3* 변이보다 상위에 위치하며 각 클래스 내의 변이는 서로 상호 작용하고 있음이 밝혀졌다 (Fukuda et al. 2011; Kumamaru et al. 1988; 2010; Satoh-Cruz M et al. 2010; Satoh et al. 1994; 1995; 1999; Takemoto et al. 2002; Ueda et al. 2010).

글로부린 집적 제어기구

벼의 주요 글로부린은 26 kD의 α -globulin으로 서브유닛

구조는 가지지 않고 모노머로 존재한다. 알파글로부린도 소포체상에서 합성되어 골지체를 경유하여 PB-II로 수송, 집적된다. 알파글로부린의 집적부위는 글루텔린과 다르며 PB-II의 주변부에 존재한다 (Krishnan et al. 1992). 알파글로부린의 일차구조는 프롤라민과 유사하며 시스테인 잔기에 의한 LxxC 모티프 (A 도메인), CCxQL 모티프 (B 도메인), PxxC (C 도메인) 간 분자간 이황화결합으로 형성된다. 이들 도메인은 폴리펩티드쇄를 적절히 접는 구조를 형성하여 세포내로 위치하는데 중요한 것으로 나타났다 (Kawagoe et al. 2005). AB 도메인만을 가진 알파글로부린은 PB-I로 잘못 수송되었다. A도메인의 시스테인 잔기가 프롤라민의 시스테인 잔기와 반응하여 소포체 내강에 잔류하는 것으로 생각되며 B도메인의 CC₇₉xQL의 C79S로 바뀐 단백질은 PB-II로 제대로 수송되었다. Cys79는 C도메인의 시스테인 잔기와 분자내 이황화결합을 형성한다. Cys79를 제거한 경우 알파글로부린은 적절한 구조를 형성하는 것으로 생각된다 (Kawagoe et al. 2005). 감마선 조사에 의해 만들어진 알파 글로부린 결손 돌연변이계통으로부터 알파글로부린 유전자는 단일 열성유전자에 의해 지배되며 5번 염색체에 존재하고 유전자발현이 되지 않는 것으로부터 알파글로부린 유전자에 돌연변이가 발생한 것으로 생각된다 (Iida et al. 1998).

이와 같이 벼 종자배유에 존재하는 3 종류의 저장단백질인 글루텔린, 프롤라민, 글로부린은 다른 벼과 곡류와는 달리 혼재하여 존재하지 않고 소포체와 저장형액포로 따로 축적된다. 벼에서 배유내 mRNA 표적수송기구, 소포체내에서의 분자 사폐론작용기구, 글루텔린과 글로부린을 소포체로부터 수송하는 세 기구가 효율적으로 기능한 결과, 분별 축적이 가능하게 된다.

벼 종자 내재 저장단백질의 조성 변경

돌연변이에 의한 저장단백질 조성변경

돌연변이에 의한 저장단백질 함량 연구는 1970년대에 활발히 이뤄졌고 함량 변경을 시도한 연구 결과, 초형 및 출아가 단백질 함량과의 상호관계가 있음이 밝혀졌고, 단간, 조생일수록, 또한 소립일수록 단백질 함량이 높은 경향이 있음을 알게 되었다. 저장단백질 조성에 관한 돌연변이체 연구는 1980년대 후반에 큐슈대학에서 방사선육종으로 시도되었으며, 얻어진 돌연변이체는 SDS-PAGE 전기영동 분석법으로 비교적 간단하게 단백질 조성을 분석하여 14종으로 분류되었다 (Iida 1996). 이들 단백질 조성 변경 돌연변이체를 이용한 실용화 품종 개발과 동시에 돌연변이 기구 해석 연구도 이뤄졌다.

벼 종자 저장단백질 중 16 kDa의 알리지 단백질이 감

소된 돌연변이체를 확인하였고 (Nishio and Iida, 1993), 이 변이체 종자는 계면활성제를 함유한 염수에 침전하여 압착처리한 후 흐르는 물에 세척하고 단백질을 분해효소로 저알리지화하여 시판하고 있는 제분과 거의 유사한 정도로 16 kDa 단백질이 감소됨을 확인, 품종 등록하였다 (Takano et al. 1993). 그러나 쌀 알리지 환자는 16 kDa 단백질뿐만 아니라 다른 단백질에 대해서도 알리지 반응을 나타냄을 알게 되어 환자에 바로 적용하기는 곤란하게 되어 추가적인 연구가 진행되고 있다 (Ito et al. 2005).

고령화에 따른 신장 기능저하와 당뇨 합병증으로 인한 신장병의 증가가 매해 증가되고 있는 추세이다. 신장 이상은 단백뇨와 혈뇨, 또는 요소질소 등의 노폐물이 혈중에 남아 발견되지만 이에 대한 치료 식이요법 중의 하나가 단백질 섭취량의 제한하여 신장질환의 진행을 늦추는 방법이다. 2001년 에틸렌민 처리로 얻어진 저 글루테린 돌연변이체 (Low glutelin content, LGC-1)는 글루테린이 절반이하로 감소하고 프롤라민이 2배이상 증가한 품종이다. 이 품종은 소화성이 높은 글루테린 단백질이 줄고 난소화성 단백질인 프롤라민이 증가한 실질적인 저단백미로 신장질환자의 식이요법용 주식으로써의 가능성에 대한 임상시험을 수행한 결과, 일반 정백미와 비교할 때 장기사용이 가능하며 신장 기능저하 진행을 늦추는 효과가 있음을 확인하여 만성신부전환자의 식이요법용 주식으로서 유용함을 시사하였다. 한편 LGC-1의 구조와 기능을 해석하는 연구도 수행되었는데, GluB 단백질에 속하는 $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ (글루테린의 산성 서브유닛)이 완전히 결실되어 있고 GluA 단백질에 속한 $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ 의 유전자 발현 억제는 충분치 않음이 확인되었다. 현재까지 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ 각각 결손된 돌연변이체가 2번, 10번, 1번 염색체상이 존재함이 확인되었다 (Iida et al. 1997). 정상 벼에서는 GluB 단백질을 코드하고 있는 매우 상동성이 높은 *GluB4*와 *GluB5*가 역방향으로 나란히 위치하고 있으나 LGC-1 돌연변이체에서는 이들 두 유전자 사이에 약 3.5 kb의 결실로 인해 *GluB5* 유전자의 전사종결부위가 없어지고 *GluB4* 유전자로부터의 전사가 *GluB5* 유전자까지 진행되는 형태가 되었다. 그 결과, 양 유전자간 상보적인 염기서열을 가지는 RNA 구조로 헤어핀 RNA가 만들어져 RNA 간섭 (RNAi) 기능을 갖게 되어 글루테린 유전자 발현 억제로 인해 글루테린 함량이 저하됨이 밝혀졌다 (Kusaba et al. 2003).

감마선조사에 의해 26 kDa 글로불린 결손 돌연변이체가 육성되었고 소화성 단백질인 26 kDa 글로불린 단백질이 완전히 결손됨을 확인하였다. 26 kDa 글로불린 결손 돌연변이체와 LGC-1를 교배한 품종도 육성되었는데 글루테린과 글로불린이 동시에 감소되어 소화용이성 단백질이 1/3정도 감소하였고 난소화성 단백질인 프롤라민이 약 2.5배 증가하였다.

생명공학기술에 의한 저장단백질 조성변경

유전공학적 기술에 의한 단백질 함량 및 조성 변경 연구도 활발히 이뤄지고 있다. 일본에서는 antisense RNA 기법을 이용한 글루테린 억제 형질전환체가 육성되어 유전자변형작물의 안전성 평가시험도 수행되었다 (Ohyama et al. 2001). 최근에는 RNAi 기법을 이용하여 글루테린 발현 억제, GluB 발현억제, GluB와 글로불린 단백질 다중발현 억제, 13 kDa-, 10 kDa-, 16 kDa-프롤라민 발현억제 형질전환 벼 종자를 확보하여 저장단백질의 축적양상을 분석한 결과, 목표로 한 특정 저장단백질은 감소되는 반면 다른 저장단백질 함량이 증가하여 전체 종자 저장단백질 함량은 일정하게 유지됨을 확인하였다 (Kawakatsu et al. 2010). 또한 13 kDa-프롤라민 단백질이 감소한 경우에는 곡류 저장단백질에 부족한 라이신 함량이 일반 벼에 비해 56% 증가되어 영양적으로 개량되었고, 프롤라민 단백질이 집적되는 단백질과립-1의 크기도 작아지고 모양도 변화가 일어남을 확인하였다. 이와 같이 특정 저장단백질 발현 조절을 통한 필수 아미노산 라이신 증대에 의한 영양 강화는 글루테린 유전자군의 아미노산 서열분석을 통한 결과로 부터도 시사되었는데, *gluB7* type가 과발현시 lysine 함량이 증대됨을 기대할 수 있으리라 생각된다 (Yoon et al. 2011). 한편 벼 종자내 유리 라이신 함량과 저장단백질 집적을 결정하는 주요 조절인자 중의 하나인 라이신 분해 등 양기능 분해효소(bifunctional lysine-degrading enzyme)인 lysine ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase (LKR/SDH)가 종자 저장단백질의 주요 전사조절인자, 즉 RISBZ1, RPF에 의해 직접적으로 조절 받고 있음이 밝혀졌다. RISBZ1, RPF 중 어느 하나가 감소하면 LKR/SDH도 줄어들고 벼 곡립내 유리 라이신 함량이 증가한다. 이 결과는 이들 전사인자가 감소한 경우에만 종자 저장단백질 함량이 감소되는 사실과 대조적인 점으로부터 종자 저장단백질과 유전자와 LKR/SDH는 같은 전사인자에 의해 조절 받더라도 별도의 조절기구가 존재함을 시사하고 있다 (Kawakatsu and Takaiwa 2010).

이종 저장단백질 발현에 의한 벼 종자단백질의 개량

영양 및 생리기능 강화

콩 단백질은 항비만 및 동맥경화, 당뇨 등에 생리학적으로 효과적인 단백질로 알려져 있다 (Davis et al. 2005a, 2005b). 콩의 주요 저장단백질은 크게 2종류로 글리시닌 (glycinin, 11S globulin)과 베타 콘글리시닌 (β -conglycinin, 7S globulin)이다. 글리시닌은 젤화 및 유화 (emulsification)와 같은 식품 가공적성을 가지며 영양적으로는 필수아미

노산인 라이신 풍부하여 영양, 생리활성, 물성적 측면에서 매우 유용한 단백질이다 (Utsumi et al. 1992). 또한 베타 콘글리시닌은 콩 단백질의 70%를 차지하며 혈청 콜레스테롤 및 triglyceride와 저밀도 콜레스테롤 (LDL-cholesterol)을 낮추는 생리 기능이 있는 것으로 밝혀져 있다 (Sirtori et al. 1995; Aoyama et al. 2000; Sirtri and Lovati 2001). 콩 글리시닌 단백질은 벼 종자 단백질에는 부족한 라이신 등의 영양성분이나 생리기능을 강화할 수 있는 강력한 후보 단백질로 판단된다. 콩의 글리시닌 유전자 2종 (A1aB1b, A3B4)을 벼 배유 프로모터를 이용하여 과발현시킨 결과, A1aB1b 단백질은 벼 글루텔린 단백질과 함께 단백질 과립-II에 전체 종자단백질의 4.5%까지 집적되었고, A3B4 단백질은 전체 종자단백질의 약 1.5% 수준으로 단백질 과립-II과 -I에 집적되었다. 상기 두 유전자 동시 발현한 결과, self-assembly 되어 두 단백질 모두 단백질 과립-II에 집적되었고 단일유전자 도입 시의 2배 정도 발현이 증가됨을 확인하였다 (Takaiwa et al. 2008). 콩의 콘글리시닌 단백질은 α , α' , β 의 서브유닛으로 구성되는 trimeric 단백질로 ER에서 trimer로 회합되어 단백질 저장액포에 집적된다. 베타 콘글리시닌의 α' , β -subunit 유전자를 벼 종자에 각각 과 발현시킨 결과, α' subunit이 벼의 글루텔린과 이황화결합을 형성함으로써 β -subunit 보다 2배 정도 높게 단백질 과립-II에 집적되었고, α' , β -subunit 유전자를 동시 발현했을 때는 $\alpha'\beta$ -subunit가 글루텔린과 함께 단백질 과립-II에 집적됨을 알 수 있었다 (Motoyama et al. 2010). 이로부터 이종의 저장단백질 도입 시 이종 단백질간의 상호작용뿐만 아니라 벼 저장단백질과의 상호작용을 통하여 이종 저장단백질이 수송되고 안정화됨을 알 수 있다.

가공적성 개량

곡류의 저장단백질과 관련한 가공적성 연구는 밀의 저장단백질을 중심으로 많은 연구가 수행되고 있다. 밀의 반죽성에 결정적인 기능을 하는 것은 글루텐으로 밀의 주요 저장단백질인 글루테닌과 글리아딘을 중심으로 수화 반응에 의해 형성되는 거대 중합체 (macropolymer)이다. 밀 글리아딘은 벼의 프롤라민 계열 단백질로 밀의 주 저장단백질이며, 글루테닌은 글루텐의 점탄성에 미치는 영향은 크다. 글루테닌은 전기영상의 이동상에 따라 고분자 글루테닌 (high molecular weight-glutenin subunit, HMW-GS) 과 저분자 글루테닌 (Low molecular weight-glutenin subunit, LMW-GS)으로 분류된다. 저분자 글루테닌(Low molecular weight-glutenin subunit, LMW-GS)은 거대 중합체를 만드는데 관여하며 글루텐의 인성(extensibility)과 점성(viscosity)에 관련이 있다. 고분자 글루테닌(high molecular weight-glutenin subunit, HMW-GS)은 양적으로는 밀 단백질에서

차지하는 비중은 적지만 글루텐의 탄성(elasticity)을 결정하므로 가공적성에는 매우 중요한 단백질이다. HMW-GS 유전자를 호밀, 듀럼밀, 일반 밀 등 밀속 작물에 도입했을 때 중합체 형성이 강화되는 결과를 보여주었다 (Rooke et al. 1999; Popineau et al. 2001; Altpeter et al. 2004; Gadaleta et al. 2008). 가공적성이 부족한 벼를 대상으로 HMW-GS 또는 LMW-GS 유전자를 도입하여 가공적성을 개량하는 연구가 시도되었다. HMW-GS 1Dx 유전자를 과발현 시켰을 때 배유 저장단백질 중 알코올용해성 단백질의 0.75 ~ 3.17%로가 집적됨을 확인하였다(Ozvald et al. 2007). HMW-GS와 LMW-GS 유전자를 각각 포함하는 TAC (transformation-competent artificial chromosome)을 벼에 도입하여 얻어진 형질전환체를 서로 교배한 결과, 두 유전자가 모두 벼 배유에서 발현되었으며 밀의 mature GS와 같은 위치에서의 processing이 확인되었고, 또한 밀과 유사한 insoluble polymeric protein을 형성하는 것을 확인하였다 (Araki et al. 2008). 이는 벼와 밀의 단백질-processing 시스템은 밀과 벼에 보존되어 있어 밀 글루텐 단백질이 벼에서도 축적이 가능할 것임을 시사한다. 본 연구진도 제면, 제빵, 제과 등 용도별로 육성된 밀 재배품종을 이용하여 가공적성과 관련한 HMW-GS 및 LMW-GS 유전자군의 구조 및 프로테오믹을 해석하고, HMW-GS 및 LMW-GS 유전자를 도입하여 가공적성이 개량된 벼 육성 연구를 수행하고 있다 (Lee et al. 2010).

전 망

쌀은 주성분이 전분으로 쌀을 주식으로 하는 민족에게는 중요한 에너지원이기도 하지만 동시에 단백질 공급원으로서도 중요한 역할을 한다. 특히 한국인에게 쌀 단백질은 총 단백질 섭취량의 24%를 차지할 정도로 중요한 영양성분이기도 하다. 따라서 쌀의 총 단백질 함량을 높이거나 낮추는 것 뿐 아니라 쌀 저장단백질 조성의 조절을 통한 쌀 단백질 개량은 매우 중요한 연구 분야라 할 수 있다. 벼 염색체 해독이 완료된 이후 타 작물과의 유전체 비교분석 및 전사체, 단백질체, 대사체 연구가 가속화되고 종합적인 연구 결과 분석을 통해 종자 저장단백질 등 저장물질의 전체적인 이해가 가능해질 것으로 기대된다. 이러한 저장물질의 종합적인 연구결과는 종자 저장단백질의 특성 및 발현기작 조절을 가능하게 하여 저장단백질의 영양성 강화, 가공적성 개량뿐만 아니라 고온 등숙기의 저장물질 대사연구를 통하여 지구온난화와 관련한 생리학적 과정을 이해하고 고온에 의해 저장단백질 및 전분 등의 저장물질 감소로 이어지는 주요 대사단계를 규명함으로써 기후변화에 대응한 안정적인 생산량을 확보할 수 있는 작물 육성 연구도 가능할 것으로 생각된다.

적 요

벼는 세계 인구의 60%에 의해 소비되고 있는 주요 식량 작물이며 그 종자의 주성분은 탄수화물로 인류의 중요한 에너지원이 된다. 미곡(米穀)은 주식으로 다량 섭취하게 되는데 특히 동물성 단백질의 섭취가 부족한 국가 또는 지역에서는 쌀 단백질이 콩 단백질과 함께 중요한 영양 공급원이 되고 있어 벼의 종자단백질은 인류에 매우 중요한 영양성분이라 할 수 있다. 그런데 벼의 종자단백질은 필수아미노산인 라이신이 부족하므로 아미노산 조성 변경에 의한 영양적인 개량이 요구되기도 하는 한편 선진국에서는 혈압조절이나 면역증강 등 생리기능을 가진 건강증진용 기능성 단백질 또는 펩티드로 주목받고 있다. 따라서 벼의 종자단백질의 조성변경과 더불어 이중의 저장단백질의 도입에 의한 벼 종자단백질 개량 연구가 진행되어 왔다. 본 총설에서는 벼의 종자 저장단백질의 생합성과 축적 특징 및 저장단백질 집적의 유전적 제어 기작에 대하여 알아보고 또한 벼 종자 저장단백질 조성 변경, 이중단백질 도입에 의한 벼 종자 저장단백질 개량 연구 현황을 기술하고자 한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업 (과제번호 PJ006680, PJ907133)의 연구지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

- Altpeter F, popelka JC, Wieser H (2004) Stable expression of 1Dx5 and 1Dy10 high-molecular-weight glutenin subunit genes in transgenic rye drastically increases the polymeric gluten fraction in rye flour. *Plant Mol Biol* 54:783-792
- Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamoto T (2000) Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition* 16:349-354
- Araki E, Ikeda T, Ohgihara Y, Toyoda A, Yano H (2008) Development of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) expressing wheat high- and low-molecular-weight glutenin subunit proteins. *Breed Sci* 58:121-128
- Bechtel DB, Juliano BO (1980) Formation of Protein Bodies in the Starchy Endosperm of Rice (*Oryza sativa* L.): A Re-investigation. *Ann Bot* 45:503-509
- Bewley DJ, Black M (1985) Seeds, physiology of development and germination. Plenum press, New York, pp 1-27
- Choi SB, Wang C, Muench DG, Ozawa K, Franceschi VR, Wu Y, Okita TW (2001) Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains. *Nature* 407:765-767
- Davis J, Iqbal MJ, Steinle J, Oitker J, Higginbotham DA, Peterson RG, Banz WJ (2005a) Soy protein influences the development of metabolic syndrome in male obese ZDFxSHHF rats. *Horm Metab Res* 37:316-325
- Davis J, Steinle J, Higginbotham DA, Oitker J, Peterson RG, Banz WJ (2005b) Soy protein influences insulin sensitivity and cardiovascular risk in male lean SHHF rats. *Horm Metab Res* 37:309-315
- Fukuda M, Satoh-Cruz M, Wen L, Crofts AJ, Sugino A, Washida H, Okita TW, Ogawa M, Kawagoe Y, Maeshima M, Kumamaru T (2011) The small GTPase Rab5a is essential for intracellular transport of proglutelin from the golgi apparatus to the protein storage vacuole and endosomal membrane organization in developing rice endosperm. *Plant Physiol* 157:632-644
- Furukawa S, Tanaka K, Masumura T, Ogiwara Y, Kiyokawa Y, Wakai Y (2006) Influence of rice proteins on eating quality of cooked rice and on aroma and flavor of sake. *Cereal Chem* 83:439-446
- Gadaleta A, Blechl AE, Nguyen S, Cardone MF, Ventura M, Quick JS, Blanco A (2008) Stably expressed D-genome-derived HMW glutenin subunit genes transformed into different durum wheat genotypes. *Mol Breed* 22:267-279
- Hamada S, Ishiyama K, Sakulsingharoj C, Choi SB, Wu Y, Wang C, Singh S, Kawaia N, Messing J, Okita TW (2003) Dual regulated RNA transport pathways to the cortical region in developing rice endosperm. *Plant Cell* 15:2265-2272
- Iida S (1996) Screening and genetic analysis of rice [*Oryza sativa*] seed storage protein mutants. *Gamma Field Symposia* 34:31-48
- Iida S, Kusaba M, Nishio T (1997) Mutants lacking glutelin subunits in rice: mapping and combination of mutated glutelin genes. *Theor Appl Genet* 94:177-183
- Iida S, Miyhara K, Nishio T (1998) Rice mutant lines lacking α -globulin. *Breed Sci* 48:45-49
- Ito M, Kato T, Mastuda T (2005) Rice allergenic proteins, 14-16 kDa albumin and α -globulin, remain insoluble in rice grains recovered from rice miso (rice-containing fermented soybean paste). *Bioci. Biotechnol. Biochem* 69:1137-1144
- Katsube-Tanaka T, Duldulao JB, Kimura Y, Iida S, Yamaguchi T, Nakano J, Utsumi S (2004) The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. *Biochim Biophys Acta* 1699:95-102
- Kawagoe Y, Suzuki K, Tasaki M, Yasuda H, Akagi K, Katoh E, Nishizawa NK, Ogawa M, Takaiwa F (2005) The critical role of disulfide bond formation in protein sorting in the endosperm of rice. *Plant Cell* 17:1141-1153
- Kawakatsu T, Yamamoto MP, Hirose S, Yano M, Takaiwa F (2008) Characterization of a new rice glutelin gene GluD-1 expressed in the starchy endosperm. *J Exp Bot* 59:4233-4245
- Kawakatsu T, Hirose S, Yasuda H, Takaiwa F (2010) Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. *Plant Physiol* 154:1842-1854

- Kim W, Okita T (1988) Structure, expression, and heterogeneity of the rice seed prolamines. *Plant Physiol* 88:649-655
- Krishnan HB, White JA, Pueppke SG (1992) Characterization and localization of rice (*Oryza sativa* L.) seed globulins. *Plant Sci* 81:1-11
- Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, Omura T, Ogawa M, Tanaka K (1988) Mutants for rice storage proteins. *Theor Appl Genet* 76:11-16
- Kumamaru T, Uemura Y, Inoue Y, Takemoto Y, Siddiqui SU, Ogawa M, Hara-Nishimura I, Satoh H (2010) Vacuolar Processing Enzyme plays an Essential Role in the Crystalline Structure of Glutelin in Rice Seed. *Plant Cell Physiol* 51:38-46
- Kusaba M, Miyahara K, Iida S, Fukuoka H, Takano T, Sassa H, Nishimura M, Nishio T (2003) Low glutelin content1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell* 15:1455-1467
- Lee JY, Kim YT, Kim BM, Lee JH, Lim SH, Ha SH, Ahn SN, Nam MH, Kim YM (2010) Cloning of low-molecular-weight glutenin subunit genes an identification of their protein products in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Kor J Breed Sci* 42:547-554
- Li X, Wu Y, Zhang DZ, Gillikin JW, Boston RS, Franceschi VR, Okita TW (1993a) Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. *Science* 262:1054-1056
- Li X, Franceschi VR, Okita TW (1993b) Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm cells. *Cell* 72:869-879
- Masumura T, Shibata D, Hibino T, Kato T, Kawabe K, Takeba G, Tanaka K, Fujii S (1989) cDNA cloning of an mRNA encoding a sulfur-rich 10 kDa prolamine polypeptide in rice seeds. *Plant Mol Biol* 12:123-130
- Masumura T, Hibino T, Kidzu K, Mitsukawa N, Tanaka K, Fujii S (1990) Cloning and characterization of a cDNA encoding a rice 13 kDa prolamine. *Mol Gen Genet* 221:1-7
- Mitsukawa N, Hayashi H, Yamamoto K, Kidzu K, Konishi R, Masumura T, Tanaka K (1998) Molecular cloning of a novel glutelin cDNA from rice seeds. *Plant Biotech* 15:205-211
- Mitsukawa N, Konishi R, Kidzu K, Ohtsuki K, Masumura T, Tanaka K (1999) Amino acid sequencing and cDNA cloning of rice seed storage proteins, the 13kDa prolamins, extracted from type I protein bodies. *Plant Biotech* 16:103-113
- Motoyama T, Okumoto Y, Tanisaka T, Utsumi S, Maruyama N (2010) Co-expression of α' and β subunits of β -conglycinin in rice seeds and its effect on the accumulation behavior of the expressed protein. *Transgenic Res* 19:819-827
- Muench DG, Wu Y, Zhang Y, Li X, Boston RS, Okita TW (1997) Molecular cloning, expression and subcellular localization of a BiP homolog from rice endosperm tissue. *Plant Cell Physiol* 38:404-412
- Muench DG, Ogawa M, Okita TW (1999) The prolamins of rice. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 93-108
- Nishio T, Iida S (1993) Mutants having a low content of 16-kDa allergenic protein in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 86:317-321
- Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, Omura T, Kasai Z, Tanaka K (1987) Purification of Protein Body-I of Rice Seed and its Polypeptide Composition. *Plant Cell Physiol* 28:1517-1527
- Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, Omura T, Park T, Shintaku K, Baba K (1989) Mutants for rice storage proteins. *Theor Appl Genet* 78:305-310
- Ohyama A, Maruta Y, Ito T, Ueki J, Hiei Y, Nitta N (2001) Environmental risk evaluation of rice plants transformed with chimeric antisense cDNA for glutelin. *Jan Soc Breed* 3: 139-149
- Okita T, Hwang Y, Hnilo J, Kim W, Aryan A, Larson R, Krishnan H (1989) Structure and expression of the rice glutelin multigene family. *J Biol Chem* 264:12573-12581
- Osborn T (1924) The vegetable proteins. London, FL: Longmans, Green and Co
- Ozvald M, Jenes B, Tomoskozi S, Bekes F, Tamas L (2007) Expression of the 1Dx high molecular weight glutenin subunit proteins in transgenic rice. *Cereal Res Comm* 35:1543-1549
- Popineau Y, Deshayes G, Lefebvre J, Fido R, Tatham AS, Shewry PR (2001) Prolamin aggregation, gluten viscoelasticity, and mixing properties of transgenic wheat lines expressing 1Ax and 1Dx high molecular weight subunit transgenes. *J Agric Foo Chem* 49:395-401
- Rooke L, Bekes F, Fido R, Barro F, Gras P, Tatham AS, Barcelo P, Lazzari P, Shewry PR (1999) Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *J Cereal Sci* 30:115-120
- Satoh-Cruz M, Crofts AJ, Takemoto-Kuno Y, Sugino A, Washida H, Crofts N, Okita TW, Ogawa M, Satoh H, Kumamaru T (2010) Protein Disulfide Isomerase Like 1-1 Participates in the Maturation of Proglutelin Within the Endoplasmic Reticulum in Rice Endosperm. *Plant Cell Physiol* 51: 1581-1593
- Satoh H, Kumamaru T, Yoshimura S, Ogawa M (1994) New 57 kDa glutelin genes on chromosome 9 in rice. *Rice Genet Newslett* 11:158-161
- Satoh H, Kumamaru T, Ogawa M, Shiraiishi M, Im BG, Son MY, Takemoto Y (1995) Spontaneous "57H" mutants in rice. *Rice Genet Newslett* 12:194-196
- Satoh H, Li WX, Takemoto Y, Ito T, Kumamaru T (1999) glup4 controlling a 57H character was located on chromosome 12 in rice. *Rice Genet Newslett* 12:98-100
- Shewry PR, Halford NG (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* 53:947-958
- Sirtori CR, Lovarti MR, Manzoni C, Moneti M, Pazzucconi F, Gatti E (1995) Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *J Nutr* 46:598-605
- Sirtori CR, Lovarti MR (2001) Soy proteins and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 3:47-53
- Suzuki K, Hattori A, Tanaka S, Masumura T, Abe M, Kitamura S (2005) High-coverage profiling analysis of genes expressed during rice seed development, using an improved amplified

- fragment length polymorphism technique. *Funct Inter Genomics* 5:117-127
- Takaiwa F, Oono K (1991) Genomic DNA sequences of two new genes for new storage protein glutelin in rice. *Jpn J Genet* 66: 161-171
- Takaiwa F, Sakuta C, Choi SK, Tada Y, Motoyama T, Utsumi S (2008) Co-expression of soybean glycinin A1aB1b and A3B4 enhances their accumulation levels in transgenic rice seed. *Plant Cell Physiol* 49:1589-1599
- Takaiwa F, Yamanouchi U, Yoshihara T, Washida H, Tanabe F, Kato A, Yamada K (1996) Characterization of common cis-regulatory elements responsible for the endosperm-specific expression of members of the rice glutelin multigene family. *Plant Mol Biol* 30:1207-1221
- Takano T, Tsubaki K, Ikezawa Z, Nishio T (1993) Evaluation of a rice (*Oryza sativa*) mutant as a material of hypoallergenic rice. *Japanese J Breed* 43:389-394
- Takemoto Y, Coughlan SJ, Okita TW, Satoh H, Ogawa M, Kumamaru T (2002) The rice mutant *esp2* greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase. *Plant Physiol* 128:1212-1222
- Tanaka K, Sugimoto T, Ogawa M, Kasai Z (1980) Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. *Agri Biol Chem* 44:1633-1639
- Ueda Y, Satoh-Cruz M, Matsusaka H, Takemoto-Kuno Y, Fukuda M, Okita TW, Ogawa M, Satoh H, Kumamaru T (2010) Gene-gene interactions between mutants that accumulate abnormally high amounts of proglutelin in rice seed. *Breed Sci* 60: 568-574
- Utsumi S (1992) Plant food protein engineering. *Adv Food Nut Res* 36:89-208
- Xu JH, Messing J (2009) Amplification of prolamin storage protein genes in different subfamilies of poaceae. *Theor Appl Genet* 119:1397-1412
- Yamagata H, Sugimoto T, Tanaka K, Kasai Z (1982a) Biosynthesis of Storage Proteins in Developing Rice Seeds. *Plant Physiol* 70:1094-1100
- Yamagata H, Tanaka K, Kasai Z (1982b) Evidence for a precursor form of rice glutelin subunits. *Agri Biol Chem* 46:321-322
- Yoon UH, Kim CK, Lee GS, Hahn JH, Lee J, Kim Y, Ji HS, Mun JH, Lee TH, Kim TH (2011) Structural and expression analysis of glutelin genes in *Oryza sativa* L. *J Plant Biotechnol* 38:176-185