

최 종
연구보고서

633.18

L2937

기능성쌀 종자의 개발
Development of Funtional Rice Lines

연구기관
강원대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 쌀 종자의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 11. 30

주관연구기관명: 강원대학교

총괄연구책임자: 최 용 순

연 구 원: 이 해 익

연 구 원: 윤 경 민

연 구 원: 차 상 훈

협동연구기관명: 강원도농촌진흥원

협동연구책임자: 박 승 의

여 백

요 약 문

I. 제 목

기능성 쌀종자의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

다자간 UR 협정체결이후 상대적으로 경쟁력이 약한 한국의 쌀생산기반을 보호하고 나아가 국제경쟁력을 제고시키기 위한 연구와 관심이 집중되어 왔다. 이를 극복하는 한 방안으로, 쌀의 고부가가치화를 위한 쌀 품종의 개량 및 개발은 쌀생산기반의 유지와, 국제적인 경쟁력을 갖출 수 있는 중요한 전략중 하나이다. 지금까지 한국에서의 쌀 육종은 주로 생산성을 향상시키거나 미질을 높이는 방향으로 진행되어져 왔으나, 곡물의 기능성을 높이는 즉, 특수한 식품영양학적으로 기능성을 갖는 종자개발에 대한 관심이나 연구는 행하여져 오지 않았다. 특히, 한국인에게 영양학적으로 절대량 부족한 칼슘 (영양권장량의 75%) 의 생체이용도를 높이기 위한 성분개량 예를 들면, 저 피틴산함유쌀의 개발이나, 또는 식생활의 변화로 유아기로 부터 소아기에 걸쳐 일어나기 쉬운 알러지저감화 쌀의 개발등을 지표로 벼 품종의 육종에 통합적으로 적용 또는 응용된 바는 없다.

본 연구의 목적은 저피틴산쌀과 저알러지쌀종자의 개발을 목표로 하여, 쌀의 고부가가치의 극대화과 국제경쟁력의 향상과 더불어 적극적농업으로서 수출품종개발을 위한 새로운 육종모델을 제시하고 나아가 국민의 수면연장으로 노년층의 비율이 증가하고 이에 따라 노년이나 여성에게서 칼슘부족에 의한 골질질환이 급증하는 상황에서 무방비상태의 의료비를 줄이고, 국민건강증대를 위한다는 목적으로 계획 수행되었으며, 여기에 본 연구의 중요성이 있다 하겠다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 미네랄의 생체이용도를 높힐 수 있는 저 phytate 쌀과 저알러지쌀 개발을 목적으로 연구내용은 첫째 Phytate 가 생체에 미치는 영향, 둘째 Low Phytate Rice 의 탐색

및 응용, 셋째 벼 수정란의 MNU처리에 의한 phytate 저함량계통의 선발 및 유전분석, 넷째 Low Phytate Rice 육종을 위한 분자유전학적 연구, 다섯째 알레르기질환을 일으키는 쌀 단백질의 유전자분석 및 저알레르기벼의 개발을 위한 기초연구등 크게 5과제로 나누어 3년간 시행하게 된다.

III. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

Phytate 섭취가 증가할수록 체내의 미네랄이용도는 감소한다. 동물실험결과로 부터 phytate 섭취는 나이에 따라 식이효과의 차이를 보였다. 식이 phytic acid는 식사의 한 성분으로 일생동안 섭취하기 때문에 적은 량이라도 생체에서 미치는 축적된 효과는 적지 않다. phytic acid를 장기간 투여시 혈청콜레스테롤농도는 단기간 투여와는 달리 증가하는 결과를 나타내었다. 이러한 생리적 측면에서 phytic acid는 antinutrient로서 작용함을 알 수 있었다.

본 연구팀에 의해 기능성쌀로서 제작된 LPR (Low phytate rice)를 한국인이 섭취할 때 하루 약 100mg의 칼슘의 부가적인 섭취효과가 있으며, 이는 현재의 Ca 영양 권장량의 90% 이상 충족시킬 수 있는 가치를 갖는다. 이러한 측면에서 phytic acid 함량을 낮춘 쌀의 개발은 국민건강향상에 중요한 역할을 할 것으로 믿어 의심치 않는다.

일반적으로 신속하고, 정확하고, 간편한 스크리닝 방법의 확보는 목적으로 하는 식물체 선발에 있어 매우 중요하다. 저 피틴산 돌연변이체 (LPR) 스크리닝을 위한 미량분석법을 개발하였으며 단시간에 수만여개의 시료를 처리하여 LPR의 스크리닝을 가능하게 하였다. 본 연구에서는 10,000여 계통의 M₂ seed를 한 계통당 5종실을 처리하여 피틴산이 90% 이상 감소한 5계통과 70% 이상 감소한 5계통, 50% 이상 감소한 16계통을 스크리닝 하였으며 이듬해 봄 모내기 적기에 90% 이상 감소한 5계통을 파종하였다. M₃ seed는 35계통을 수확하였으며 10개의 종실을 무작위로 선택하여 반으로 절단한 후 씨눈쪽 반알은 보관하고 반쪽만으로 스크리닝한 결과 즉, 반으로 절단한 350개의 종실을 분석한 결과 피틴산이 90%이상 감소한 종실이 250여 개로 약 70%의 종실에서 90% 이상 감소한 것으로 HPLC, HVPE 또는 비색

법 등 각종 방법을 통하여 확인한 결과 밝혀졌다.

또한 LPR 의 기본적인 식품학적으로 전분의 성질, 지방산의 조성, 단백질의 조성 등은 기존의 일품과 큰 차이가 없었다. 그러나 단백질에 있어서 acid soluble fraction의 경우 LPR 이 parent보다 많은 종류의 단백질이 추출되었다. 피틴산-단백질복합체에 의해 소화효소에 의한 단백질분해가 저해하므로, 피틴산의 감소는 쌀단백질의 소화이용도를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

저 phytate 함량의 벼 종자선발을 위하여 일품 및 영덕품종에 돌연변이원으로 MNU를 처리하였으며, 저 phytate산의 돌연변이가 많이 선발된 처리시간대는 수분 후 12·13·18·20·21시간이 경과한 것이었다. 처리에 따른 온도는 처리장소의 온도와 처리액의 온도로 구분되며 전자가 25~29℃의 범위, 후자는 26~27℃의 범위가 적당한 것으로, MNU의 처리농도는 1mM이 효율적이었다. 벼수정란에 MNU 처리시간은 45~50분, 처리액의 pH는 4.8의 경우가 가장 효율적인 결과를 보였다. 저 phytate산을 함유하는 돌연변이체는 영덕벼에서 2계통, 일품벼에서 35계통이 확보되었다. 210개의 교배조합으로 부터는 적어도 2개의 대립유전자군이 존재함을 알 수 있었다. 전반적으로 저 phytate 함유 돌연변이체의 경우는 정상의 일품벼와 비교하여 생육조사의 결과가 큰 차이가 없이 출수기도 일정하고 재배 및 생육상태도 양호하였다.

피틴산 생합성 관련 유전자에 대한 마커를 개발하고 이들 유전자를 직접 분리하고자 RAPD, AFLP, DD-RT PCR, mRNA-AFLP 등의 분석을 저 피틴산 돌연변이들과 컨트롤간에 실시하였다. 또한 피틴산의 분해효소인 phytase를 벼에서 분리하고자 곰팡이 *Aspergillus*의 phytase 유전자의 보존지역의 염기서열을 기초로 한 primers를 가지고 벼에서의 phytase 유전자를 분리하고자 하였다. RAPD와 AFLP의 분석을 통하여 약 6000 여 단편들을 저 피틴산 돌연변이들과 컨트롤간에 분석 비교하였으나 다형화 밴드를 획득하지 못하였는데 이는 아마도 이들 돌연변이의 변이가 점 돌연변이에 기인한 것으로 사료된다. 그러므로 컨트롤과 돌연변이들의 유전자 발현의 차이에 의해 유전자 클로닝을 하고자 DD-RT PCR과 mRNA-AFLP 등을 실시하였다. DD-RT PCR을 이용하여 분리한 단편들

에는 콩의 cellulase 유전자와 아주 높은 상동성을 가진 단편 (T₁₁CA-250bp), 유전자 은행에 등록된 벼의 미성숙 배 발현 유전자들인 ISAJ1053 와 R1037-2B 등과 같은 염기를 가진 T₁₁CA-320 bp, T₁₁CA-300bp 단편 등을 획득하였으며 이들은 Southern 분석 결과 벼의 게놈에 단일 copy로 존재함이 확인되었다. 또한 mRNA-AFLP 분석에서도 들연변이 또는 콘트롤에 특이하게 발현되는 단편을 17개 획득하였다. 곰팡이의 phytase 프라이머로부터 증폭하여 얻은 단편의 크기는 1069 bp 이었는데 이 단편은 sense 단편은 벼의 NADH-dependent reductase와 90%의 상동성을 가지며 antisense 단편은 ADP-glucose phosphorylase subunit SH2 와 85%의 상동성을 갖는 DNA 단편으로 밝혀졌다.

저 알레르기 쌀 종자의 개발을 위해서 약 10,000계통의 일품벼 mutant를 재료로 하여 ELISA와 SDS-PAGE로 검색하여 45개 종자를 확보하였다. 이 종자들을 파종, 수확하여 동일한 방법으로 저 알레르기 쌀 종자를 검색하여 15개의 종자에서 항체와의 반응 특이성이 낮은 종자를 검색하였다. 15개의 종자를 역시 3 차년도에 파종을 하여, 14개의 종자를 수확하였다. 또한 33개의 한국산 벼품종에서 allergen을 검증한 결과 낙동, 안산, 화천찰벼 3종이 16kDa의 단백질이 낮게 분포한다는 것을 확인하고, 확보된 저 알레르기성 종자들은 type I 과민반응을 갖는 성인, 유아에게 기능성 식품으로서 충분한 가치가 있을 것으로 기대된다.

한편 쌀 알러젠의 유전자특성 분석을 위하여 rice cDNA library를 만들었으며 library를 rat anti-16kDa globulin protein polyclonal 항체를 이용하여 검색하였고, 5개의 cDNA clones이 획득되었다. 이 clone들은 13-19kDa의 유전자 재조합 단백질을 coding하고 있으며, DNA sequencing분석결과, 4 개의 cDNA clone은 RA5b와 99%의 sequence homology를 보여주었고 RAK5는 RA14c와 96%의 homology를 보여주었다. 이렇게 획득된 쌀 알러지 유전자는 한국 쌀 품종에서의 유용유전자 확보 및 유전자 이식기술등을 통한 저 알러지 쌀 종자의 개발등에 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

이상의 연구결과를 활용도와 연결하여 정리하면,

1. 저피틴산식량의 기능성 확인 (유아 및 노인의 기능성식량으로 가치확인)

2. 저피틴산 종자의 스크리닝을 위한 쾌속방법의 확립 (본 연구시 활용과 타작물에 적용시 적용)
4. 돌연변이체 선발조건의 설계를 위한 기초적 자료로의 활용 (marker 로서 활용)
5. Phytate 합성계의 대사경로의 확인 (학술적 활용)
6. 종자자료의 확립 (저피틴산쌀 (75% 감소 쌀))
7. 저피틴산 종자개발을 위한 유전적 자료의 확보 (다수확보)
8. 저알레르기 쌀종자의 개발 (유전자원 및 종자확보)
9. 쌀알러젠 유전자 및 쌀알러젠 특이적 항체의 제작 (임상학적으로 쌀알러지의 진단시 약개발가능)
10. 한국 쌀품종의 쌀알러젠 분포지도 확보 (자원확보) 등

으로 활용범위가 넓을 것으로 판단된다.

Summary

The major objective of this study is to develop the seed lines of low phytate rice and low allergen rice using Korea cultivars. For this purpose, the project is consisted of 5 research parts studying a) the influence of dietary phytic acid on metabolism in animals b) screening of low phytate rice and its application, c) screening of LPR mutants among the MNU treated mutants lines and their genetical analysis, d) molecular genetical approaches on the LPR mutants for molecular breeding, e) genetic analysis of rice allergenic protein and studies for development of low allergenic rice.

Phytate is a compound which occurs naturally in many foods derived from plants. It is capable of strong ability chelating multivalent metal ions tightly, especially calcium, iron and zinc. The binding may form very insoluble salts poorly absorbed from the gastrointestinal tract, resulting in poor bioavailability of minerals. It has suggested that people with higher calcium requirement or those with low calcium intakes should decrease phytic acid consumption. Korean Nutrition Reports indicate that the amount of calcium intake reach to 75 % of Korean RDA in adults in 1995. Thus, the development of Low Phytate Rice (LPR) may improve the health problem related especially in mineral malnutrition of Korean population. Further it may raise rice value, indirectly by the increase of income in farmers planting the LPR.

Our reports shows that Korean rices contain about 0.2 % of phytic acid on wet weight basis. Based on per capital daily consumption of rices, it is calculated that Korean people eat about 530 mg of phytate a day as a rice. If the phytate content of rices decreased up to 10 % level of normal ones, it may improve the 8% of Ca bioavailability. In animal study, dietary phytic acid decreased the content of iron or calcium in serum or liver in young ones.

However, it did not influence the TBA value in serum and liver of animals respective of ages. Although dietary phytic acid decreased the serum cholesterol level when the animals fed the diet for 1 month, the desirable effects disappeared if they fed for 4 months. The results strongly suggest that dietary phytic acid acts as antinutrients especially in Korean who are vegetarian.

In this study, screening method with small scale for screening low phytate rice(LPR) was developed and selected 5 strains among Ilpum mutant 10,000 strains. 5 LPR strains were planted in Spring 1996 and harvested 35 strains(M_3 seed). Each grain of 350 seeds(10 seeds per strains) was divided into halves. One contained embryo was stored at refrigerator and the other was used for screening LPR. The 250 of 350 seeds were selected again and phytate content was quantified phytate by HPLC, HVPE(high voltage paper electrophoresis) and colorimetric method. Phytate concentration of all 250 seeds was reduced 90% compared to Ilpum parent. The 250 seeds contained embryo were bred and M_4 seeds were harvested in Autumn 1997. The selected M_4 seeds were bred for mass production and the weight of harvested M_5 seeds were about 700 kg. The characteristic of starch, composition of fatty acids, and protein pattern in Ilpum parent as well as LPR mutant were investigated. There was no difference between LPR mutant and Ilpum parent in starch and fatty acid composition. However, Ilpum parent were considerably different from LPR mutant, in the profile of acid soluble protein. These results suggested that phytate concentration in rice seed may affect on extraction of acid soluble protein. Therefore, LPR is expected to increase the digestion rate of rice proteins in intestine.

Low phytate rices by MNU treatment were tried to develop. The fertilizing eggs were treated with MNU for 12, 13, 18, 20 or 21 hours. The optimum

temperatures of the treatment were 25~29°C in the air and 26~27°C of the MNU solution with a concentration of 1mM and pH 4.8. Also, the best mutation induction was obtained from treating for 45~50 minutes.

The number of low phytic acid rice lines obtained were two in Youngduck and 35 in Ilpum, respectively. The F1 hybrids obtained by the intercrossing between mutants showed that there were at least two genes involved in our low phytic acid mutants. The low phytic acid mutants showed not much inferior phenotypes similar in several agronomic characters to the control variety of Ilpum.

In order to develop the molecular markers and to isolate the genes involved in the phytic acid biosynthesis in rice, several molecular genetical techniques including RAPD, AFLP, DD-RT PCR, mRNA-AFLP were employed. As well, heterologous primers derived from *Aspergillus* were also used to isolate rice phytase genes. Since no polymorphic markers were detected among more than 6000 RAPD and AFLP fragments, DD-RT PCR and mRNA-AFLP were utilized to check the different messages between mutant and control plants. From the latter analyses, several different RNA messages were detected and cloned into bacterial plasmids. In the sequence comparison of the obtained fragments, we obtained *Glycine max* cellulase homologous fragments (T₁₁CA-250bp), rice immature cDNA clone (ISAJ0153) (T₁₁CA-320bp), R1037-2B (T₁₁CA-320bp). Southern blot analysis showed these fragments were present as single copy in the rice genome. In the mRNA-AFLP and reverse northern analysis, 17 fragments were obtained with control or mutant specificity. By amplifying with *Aspergillus* phytase primers, one fragment (1,069bp) was isolated. The sequence analysis revealed that this fragment was homologous to rice NADH-dependent reductase with 90% similarity in the antisense strand and

ADP-glucose phosphorylase subunit SH₂ with 85% in the sense strand.

Also, mutant seed of about 10,000 lineage were analyzed by ELISA and SDS-PAGE for the screening of low allergenic rice. 45 seeds with low allergenic content were isolated in the first year. These seeds were placed on moist filter papers, and then, harvested for screening of low allergenic rice seeds at the second year. The same method was applied, and 15 seeds were identified. Then, 15 low allergenic seeds were seeding on again moist filter papers at the third year, and 14 grains were finally harvested. On the other hand, rice allergenic content in 33 Korean cultivars were measured using ELISA and analyzed statistically the three cultivars, Nak-Dong, An-San, Hwa-Chun were identified as having low 16kDa allergenic protein. Low allergenic rice obtained can preferentially be to manufacture baby food for weaning infants as functional food.

In addition a rice cDNA library was constructed and screened with a rat anti-16kDa globulin protein polyclonal antibody in order to isolate rice allergenic cDNA clones. Five independent cDNA clones, termed RAK 1-5, were obtained after second rounds of plaque assay and immunoblot analysis. These clones encode 13-19kDa recombinant proteins upon IPTG induction respectively, and strongly recongnized by the polyclonal antibody in immunoblot. DNA sequencing analysis showed that RAK 1-4 have 99% sequence homology with RA5b, and RAK5 has 94% homology with RA14b. These Korean rice allergenic cDNA clones may be apply to the development of low allergenic transgenic rice in the near future. Among rice proteins, 14-16kDa globulin in proteins encoded by multiple gene family have been identified as major rice allergens.

여 백

CONTENTS

CHAPTER 1	Preface	1
Section 1	The Study Objective	1
Section 2	The Study Scope	5
CHAPTER 2	Effects of Dietary Phytic Acid on Living Metabolism ...	6
Section 1	Introduction	6
Section 2	Materials and Methods	8
Section 3	Results	13
Section 4	Discussion	30
Section 5	References	37
CHAPTER 3	Screening of Low Phytate Rice and its Application ...	41
Section 1	Introduction	41
Section 2	Materials and Methods	43
Section 3	Results	51
Section 4	Discussion	103
Section 5	References	107
CHAPTER 4	Screening of LPR mutants among the MNU treated mutants lines and their genetical analysis	111
Section 1	Introduction	111
Section 2	Materials and Methods	111
Section 3	Results	126
Section 4	Discussion	157
Section 5	References	162

CHAPTER 5	Molecular genetical studies on the LPR mutants for molecular breeding	165
Section 1	Introduction	165
Section 2	Materials and Methods	165
Section 3	Results	185
Section 4	Discussion	193
Section 5	References	195
CHAPTER 6	Genetic analysis of rice allergenic protein and studies for development of low allergenic rice	198
Section 1	Introduction	198
Section 2	Materials and Methods	202
Section 3	Results	209
Section 4	Discussion	232
Section 5	References	236
CHAPTER 7	General Discussion	239

목 차

제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구개발의 목적	1
제 2 절 연구범위	5
제 2 장 Phytate 가 생체대사에 미치는 영향	6
제 1 절 서 언	6
제 2 절 재료 및 방법	8
제 3 절 결 과	13
제 4 절 고 찰	30
제 5 절 참고문헌	37
제 3 장 Low phytate rice 의 탐색 및 응용	41
제 1 절 서 언	41
제 2 절 재료 및 방법	43
제 3 절 결 과	51
제 4 절 고 찰	103
제 5 절 참고문헌	107
제 4 장 벼수정란의 MNU처리에 의한 phytate 저함량계통의 선발 및 유전분석	111
제 1 절 서 언	111
제 2 절 재료 및 방법	111
제 3 절 결 과	126
제 4 절 고 찰	157
제 5 절 참고문헌	162

제 5 장	Low Phytate Rice 육종을 위한 분자 유전학적 연구 ...	165
제 1 절	서 언	165
제 2 절	재료 및 방법	165
제 3 절	결 과	185
제 4 절	고 찰	193
제 5 절	참고문헌	195
제 6 장	알레르기를 일으키는 쌀단백질의 유전자분석 및 저알레르기 벼의 개발을 위한 기초연구	198
제 1 절	서 언	198
제 2 절	재료 및 방법	202
제 3 절	결 과	209
제 4 절	고 찰	232
제 5 절	참고문헌	236
제 7 장	총 론	239

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

Phytic acid는 inositol의 여섯개의 히드록시기에 각각 하나의 인산이 에스테르 결합을 한 화합물(*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate)로서 씨앗내에서 생리적으로 중요한 무기물, 즉, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} 등과 결합되어 염의 형태인 phytin 으로 저장되어 있다.

그러나 식품영양학적으로 phytate 의 미량원소와 chelate를 만드는 성질은, 종자중 존재하는 미네랄 뿐만 아니라 다른 식품에 존재하는 칼슘, 철, 아연과 같은 무기물과 chelate를 형성하여 불용성인 phytate-mineral complex를 형성하므로 장관에서 미네랄의 흡수가 저해되는 소위 反營養的 因子로서의 역할을 하게 된다. 특히 phytate는 장관내에서 칼슘과 철의 흡수의 저해는 골다공증 및 빈혈을 유발하는 간접적인 원인이 될 수도 있다.

구미에서 조사된 1일 phytate의 섭취량은 290 mg 부터 2575 mg 으로 식사습관에 따라 커다란 섭취량의 차이를 나타내며, 일반적인 서양식사에서 아연의 경우 17 % 에서 35 % 정도, 철의 경우 8 %로 부터 22 %, 칼슘은 약 40 % 흡수를 억제하여 미량원소들의 이용도를 현저하게 감소시킨다. 쌀의 경우 재배지 및 품종에 따라 다르나 현미에 있어서 1 - 2%의 phytate가 함유되어 있다고 보고되어 있다. 한편, 한국인의 경우 서양인에 비하여 곡류 및 채식위주의 식사를 하기 때문에, 한국인의 무기물의 이용도는 더욱 감소될 가능성이 높으나, 아직까지, 식품중에 존재하는 phytate 의 함량이나, 무기물의 이용도와의 상호작용에 관한 연구는 전무하다.

1995년도 국민영양조사에 따르면 한국인의 하루 칼슘섭취량은 전국평균 약 530mg 으로 국민영양권장량 700-800 mg (나이, 성별에 따라 달라진다) 에 비하여 심각하게 낮은 66 ~ 76 % 의 량을 섭취하고 있어, 이러한 Ca 섭취의 부족은, 특히 노년기여성에서 관찰되는 골다공증의 주요한 원인이 되어진다(갱년기이후 여성의 30% 발생). 이러한 결과는 노년기에 있어 부가적인 의료비의 지출을 유발한다.

이러한 측면에서, phytate를 상당량 함유하고 있는 쌀을 주식으로 하고 있는 한국과 같은 경우, phytate 함량이 낮은 쌀의 개발 (벼 품종의 개발)은 미네랄이용도를 향상시켜, 국민 건강을 증진시키고, 국내에서 생산되는 쌀의 품질 경쟁력을 제고시킨다는 점에서 매우 중요한 과제가 된다.

한편, 음식 알레르기는 섭취되어진 특정음식물에 대하여 면역체계가 과민반응을 일으킴으로써 발생하는 질환으로 임상학적으로 두드러기, 습진, 복통 및 설사 증세를 보이며 심할 경우 사망에 이르는 과민성 면역질환의 일종이다. 이러한 음식 알레르기 증세는 나이에 관계없이 분포한다. 유아에게서 음식 알레르기를 유발할 수 있는 음식 성분은 매우 다양하나 그 중 가장 흔한 것은 우유이며 쌀 또한 음식 알레르기를 일으키는 요인으로 밝혀지고 있다. 한국을 비롯한 동양권 국가의 경우 주식이 쌀이며 따라서 유아를 위한 이유식 역시 쌀 성분이 많이 포함되어 있으므로 쌀에 있어서 음식 알레르기를 일으킬 수 있는 가능한 단백질 성분의 확인 및 추적은 매우 중요하다 하겠다.

한편 서구에서도 점차 쌀의 소비가 증가함에 따라 쌀에 대해 음식 알레르기를 가지고 있는 환자의 수가 예전에 비해 현저히 증가되고 있음이 알려지고 있다. 한국은 쌀이 주식인 동양권 국가의 하나이기는 하나 아직까지 쌀에 대한 음식 알레르기 연구는 전무한 상태이다. 그러나, 일본에서는 상당수의 인구가 쌀에 대하여 과민반응을 일으킨다는 임상적 보고가 있다 (피부염 증세가 자주 발생하는 등 과민 반응성 체질을 지니고 있는 환자의 약 10%).

따라서 한국인과 일본인의 체질이 유사하고 또한 쌀이 주식이라는 공통점을 고려해 보면 한국에서도 역시 많은 수의 과민 반응성 체질 인구가 쌀에 대하여 알레르기를 가지고 있다는 사실을 추론할 수 있다. 한편 대만에서도 312명의 천식 질환 어린이 환자중 9.3%가 벼 화분에 대한 알레르기 증세를 보이고 있음이 보고되었다.

일본에서는 이미 이들 과민성 알레르기 환자의 치료를 위하여 쌀의 성분을 효소 처리한 저 알레르기성 쌀의 사용이 실험적으로 이루어지고 있으며, 쌀의 성분 중 16kD 크기의 쌀 단백질이 이러한 쌀 음식 알레르기를 일으키는 요인이 밝혀진 바 있다.

본 연구의 배경과 중요성을 몇 category로 나누어 정리하면,

1. 기술적 측면

- 가. 쌀의 이용성 증대를 위한 새로운 기능성종자개발을 목표로 하는 육종방향이 요구됨.
- 나. 국내에서 미질육종은 종내유전변이를 이용하는 기술이 대부분이며 돌연변이를 이용한 성분육종은 거의 시도된 바 없음.
- 다. Phytate와 같은 반영양적 인자를 제거 또는 감소 시킴으로서 유용영양인자의 흡수를 향상시키고자 하는 육종기술이 벼에서는 시도된 바 없음.
- 라. Phytate 성분과 무기물간 흡수에 관련한 상관적인 함량관계를 밝힘으로서 새로운 기능성식품을 평가하는 기술을 제공함.
- 마. 건강에 대한 관심의 고조로 건강식품원료의 개발.
- 바. 쌀 알레르기 환자를 위한 특수미의 개발을 위한 기초적인 연구가 절실히 필요.

2. 경제·산업적 측면

- 가. 쌀 품종의 차별화로 국제 경쟁력을 강화한 신기능성 쌀이 생산됨.
- 나. 소비의 안정성을 확보하여 농가소득을 보장하고 UR에 대응한 전략상품으로 개발.
- 다. 국산 쌀에 대한 선호도 부여.
- 라. 국민건강증진으로 과도한 의료비지출상승의 억제.
- 마. 쌀의 다수확 및 소비감소에 의한 양곡관리재정 부담을 덜수 있음.

3. 사회·문화적 측면

- 가. 쌀 생산자의 농산물 수입 개방에 대한 불안감 해소 및 자신감 부여.
- 나. 칼슘, 철분, 아연등 무기물의 이용도를 증대함으로써 쌀의 식문화적 기능을 다변화하고 쌀에 대한 국민의 인식을 새롭게 할 필요가 있음.
- 다. 쌀의 부가가치 및 이용성 제고로 농업경영 및 농촌사회의 경제적 사회적 안정을 도모.

한편, 근래 UR 협정의 체결로 상대적으로 가격이 비싼 한국쌀의 경우 국제적 경쟁력이

거의 없어, 전략적차원에서 우리쌀을 보호하고 국제경쟁력을 제고시키는 연구가 집중되어 왔다. 이를 극복하는 한 방안으로, 고부가가치 쌀의 개발은 국내에서의 쌀생산기반의 절대적 유지 및 국제적경쟁력을 갖출 수 있는 중요한 의미를 갖는다. 이는 한국에서의 쌀 육종은 주로 생산성과 미질을 향상하는 방향으로 진행되어져 왔으나, 곡물의 기능성을 높이고자 하는 노력은 미흡한 실정이다. 본 연구 개발에서 시도할 저 Phytate 곡물의 육종은 일본, 미국을 위시한 선진국에서 이미 타 작물및 쌀에서 시도되고 있으며, 이는 국제경쟁력에서 가격뿐 아니라, 미질의 향상 또는 기능성을 부여하여 상품가치의 우위를 확보하려는 의도로 해석된다. 미국의 경우에는 Monsanto, Pioneer 등을 위시한 유수한 종자회사에서 옥수수 및 밀의 저 phytate 종자의 개발에 박차를 가하고 있으나 아직은 뚜렷한 시제품을 내놓지는 못하고 있는 실정이다. 한편 미국의 국립 농업 연구기관인 USDA/ARS 에서는 1993년에 저 phytate 옥수수의 종자 개발에 성공하여 대량 증식체제에 돌입하고 있다. 또한, 대두를 사료로 이용시 phytate에 의한 무기물흡수를 억제하기 위하여 미생물 기원의 phytase를 이용한 여러가지 가공기술이 개발되고 있으나, 쌀에서는 아직 뚜렷한 성과가 보고되고 있지는 않다. 본 연구진에 의해 유발된 영덕벼의 돌연변이 유발체(M2 seed)에 대해 저 phytate 종자의 screening을 시도한 결과 90% 이상의 phytate가 감소된 몇주의 돌연변이체를 1994년도에 이미 선발한 바 있다. 현재 선발된 돌연변이체를 재배중에 있으므로 보다 우량한 돌연변이체의 선발 및 새로운 유전자원의 확보가 본 연구의 중요한 목표이다.

제 2 절 연구범위

가. 제1 과제: Phytate가 생체 대사에 미치는 영향

1년차 : phytate 섭취에 의한 생화학적대사지표의 변동

2년차 : phytate 섭취에 의한 대사계변동에 미치는 Aging 의 영향

3년차: 장기간 phytate 투여시 대사계의 adaptation 효과

나. 제 2 과제: Low Phytate Rice 의 탐색및 응용

1년차 : Low phytate Rice 의 탐색및 응용

2년차 : LPR 의 inositol phosphates 분석및 식품학적 적성평가

3년차 : LPR 의 phytate 대사 특성

다. 제 3 과제: 벼 수정란의 MNU처리에 의한 phytate 저함량계통의 선발 및 유전분석

1년차 : MNU 처리및 돌연변이선발조건규명

2년차 : Phytate 저함량계통선발및 유전분석

3년차 : Phytate 저함량계통의 유지및 증식

라. 제 4 과제: Low phytate rice 육종을 위한 분자 유전학적 연구

1년차: MNU 처리된 phytate 돌연변이 벼의 molecular evaluation

2년차: Phytate 돌연변이에 대한 molecular marker 의 개발

3년차: Phytate 합성관련유전자의 molecular cloning

마. 제 5 과제: 알레르기를 일으키는 쌀단백질의 유전자분석및 저알레르기벼의 개발을 위한 기초연구

1년차: 쌀 cDNA library 제작

2년차 : 쌀알러젠의 유전자적 분석

3년차: 쌀알러젠의 유전자조작

제 2 장 Phytate 가 생체대사에 미치는 영향

제 1절 서 설

피틴산(Phytic acid)은 식물체의 씨앗에 존재하는 인의 저장형 화합물이며 피틴산은 여러 가지 중요한 미네랄 양이온들과 혼합되어 씨앗이 성장하는 동안 침적된다. 지금까지 많은 연구자들은 *in vivo* 또는 *in vitro* 실험에서 피틴산의 유용한 또는 그 반대의 생물학적 효과들을 제시해 왔다. 예를 들어 피틴산은 2가 양이온들에 강한 결합을 할 수 있는 능력이 있기 때문에 아연, 철, 칼슘, 구리등과 같은 미량원소들이 장에서 흡수되는 동안 그들의 생유용성을 감소시킨다.

국립 영양 조사에 따르면, WHO의 빈혈에 대한 기준에 의해 평가된 국내 평균 빈혈 빈도는 1979년에 21.4% 였다. 높은 빈혈 빈도는 철의 낮은 식이 섭취 또는 낮은 생유용과 일치한다. 쌀은 한국 사람들이 주로 소비하는 곡류 중 하나이다. 이것을 고려해 볼 때, phytic acid가 철과 다른 미네랄들의 생유용을 감소시킬 수 있기 때문에 쌀중 피틴산의 함량의 정도의 규명이 우선적으로 요구된다. 그럼에도 불구하고 이제까지 한국에서 경작된 쌀에 존재하는 피틴산과 아연, 셀레늄과 같은 미네랄들의 함량에 관한 보고는 없다.

Tuntawiroon 등은 인간에 있어서 철의 생물유용성은 약 3배까지 차이를 나타내며 이것은 쌀의 도정 정도에 따라 phytic acid의 함량이 달라지는 것에 기인된다고 보고하였다. 또한 동물에서 식이 phytic acid는 Zn의 결핍을 가져와 혈청 콜레스테롤의 현저한 감소를 유발할 수 있다는 것이 보고된 바 있다. 또한, 앞선 연구들을 통하여 혈청과 간장중 미네랄과 지질 함량은 미네랄의 생물유용성의 상태와 변화된 지방 대사를 반영한다는 것이 알려졌다.

한편, 상승된 혈중 콜레스테롤 수치는 관상 심장 질환과 심장마비에 대한 주요 위험 요소들 중 하나로 간주되고 있으므로 정상적인 범위로 혈청 콜레스테롤의 농도를 유지하는 것은 중요하다고 하겠다. 이와 관련하여 phytic acid의 다량투여(섭취량의 9%)는 동물에서 혈청 콜레스테롤 수치를 감소시킬 수 있는 가능성이 보고되어 왔다. 그러나, 실제로 사람에게 있어 식사로 공급되는 phytic acid량은 식사량의 1% 내외로 정상적인 섭취량에서 동일한

효과가 발휘되는지는 알려져 있지 않다. 또한 대부분의 동물실험은 주로 나이가 어린 동물에서 관찰되어 나이에 따른 phytic acid 섭취에 대한 응답은 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 우선 한국에서 생산되는 쌀 중 피틴산과 미네랄들의 함량에 대한 정보 및 지역간 환경에 따른 함량의 변화, 한국에서 생산된 쌀중 phytic acid 함량과 유사한 량 또는 과량의 phytic acid 를 식이에 첨가 흰쥐에 투여하여 혈청과 간장에서 미네랄과 지질농도에 미치는 phytic acid의 급여효과를 평가하고자 하였다. 두번째로 나이를 달리한 흰쥐에서 조직 지방질 농도들에 대한 phytic acid의 식이 효과들을 비교하여 식이성 phytic acid에 대한 나이의존성을 확인하고자 하였다. 마지막으로 장기간 phytic acid 섭취시 phytic acid에 대한 대사의 adaptation을 확인하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 실험재료

가. 국내산 쌀의 수집

오대(시료수(sn)=21), 진미(sn=15), 상주(sn=14), 일품(sn=6), 화성(sn=5), 봉광(sn=3), 추광(sn=3), 동진(sn=1)의 8개 품종, 총 68점의 볍씨들은 강원도 농촌진흥원로부터 획득했다. 볍씨들은 실험용 도정기를 이용하여 현미상태로 도정되었다. 두 번째 실험에서 사용된 9 점의 백미는 춘천에서 구입하였다.

나. 동물사육

1) 실험 1(1년차): 수컷 Sprague-Dawley 쥐들을 대한실험동물센터(서울)로부터 구입하여 온도(20~25℃)와 광주기(0800~2000 점등)가 조절된 사육실에서 개별 사육하였다. 쥐들을 1주일간 적응시킨 후 6마리씩 4군으로 각각 분리하여 실험식으로 자유급식토록 하였다. 4주간의 급식 후 쥐들을 10시간 동안 절식시켜 오전 10:00에 단두도살하였다. 비타민과 미네랄 혼합물들은 ICN(미국)으로부터 구입하여 식이중 첨가 하였다. 기본적인 실험식이는 American Institute Nutrition에서 권장하는 바에 기초하여 제조 하였다(Table 1).

Cholesterol은 실험식이에 0.2%로 첨가하였다. Phytic acid (dodecaodium salt originated from rice)는 Sigma Co. (St. Louis)로부터 구입하여 실험식이에 0.5(P0.5), 1.0(P1.0)과 2.0%(P2.0)로 첨가하였으며, 첨가된 phytic acid의 양만큼 sucrose를 감량하였다. 1g의 sodium phytate중 sodium을 제외한 phytic acid량은 0.7g이었다. 분변은 회생 5일전 2일 동안 수집하여 동결건조하였다. 체중증가량 및 식이섭취량은 2일 간격으로 측정하였다. 이하 모든 실험에서 특별히 언급하지 않는 한 동일조건에서 실험을 행하였다.

본 연구에서 사용한 시약은 모두 특급을 사용하였다. 미량원소측정을 위하여 AAS 분석용 시약을 사용하였다.

Table 1. The composition of experimental diets (%)

Ingredients	CON	P _{0.5}	P _{1.0}	P _{2.0}
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0
Cholesterol	0.2	0.2	0.2	0.2
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	10.0	10.0	10.0	10.0
Corn starch	15.0	15.0	15.0	15.0
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Mineral(AIN-76)	3.5	3.5	3.5	3.5
Sucrose	44.8	44.3	43.8	42.8
Vitamin(AIN-76)	1.0	1.0	1.0	1.0
Phytic acid	0	0.5	1.0	2.0

CON : Control group.

P_{0.5} : Group fed cholesterolemic diets containing 0.5% phytic acid.

P_{1.0} : Group fed cholesterolemic diets containing 1.0% phytic acid.

P_{2.0} : Group fed cholesterolemic diets containing 2.0% phytic acid.

2) 실험 2 (2년차): 1개월령과 10개월령의 Sprague-Dawley 수컷 쥐들(대한실험동물센터, 서울)을 실험 1에서와 동일한 조건에서 개별 사육하였다. 1주일간 적응시킨 후 실험동물들을 나이별로 group 당 8마리씩 각각 3군으로 분류하였다.

Table 2. Composition of experimental non-purified diet (%)

Ingredients	CONTROL	P _{0.5}	P _{2.5}
Cholesterol	0.12	0.12	0.12
Corn oil	3.20	3.20	3.20
Sodium phytate	0.00	0.71	3.57
Na ₂ HPO ₄ Anhydrous	3.31	2.65	0.00
Powdered Pellet	93.37	93.32	93.11

P_{0.5} : Group fed cholesterolemic diets containing 0.5% phytic acid

P_{2.5} : Group fed cholesterolemic diets containing 2.5% phytic acid

실험식은 4주간 자유급식시켰다. 본 실험에서 사용된 사육용 사료(삼양유치사료, 원

주)의 조성은 제조원으로부터 제공받았으며 각 조성들의 함량(%)은 수분, 7.0; 단백질, 23.0; 지방질, 5.3; 섬유소, 3.4; 회분, 7.9; 질소를 포함하지 않는 추출물, 48.9; 그리고 필요한 비타민 및 미네랄들이었다. 본 연구에서 식이중 지방질 함량은 옥수수 기름을 추가하여 10%로 조정했다. 화학적 분석결과 실험식에 사용된 상업용 사료는 0.005% 이하의 phytic acid를 함유했다. 그러므로 상업용 사료중 존재하는 phytic acid의 양은 무시되어져도 무방하다고 할 수 있다. 콜레스테롤은 0.12% 수준으로 식이에 첨가되었다. Phytic acid 는 0.5(P_{0.5}) 또는 2.5%(P_{2.5}) 수준으로 보충되었다. Sodium phytate 첨가로 인한 sodium량의 증가를 보상하기 위하여 sodium phosphate를 상용하는 실험식에 보충하였다 (Table 2).

3) 실험 4 (3년차): SPF Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 (4주령)를 구입하였다. 1주일간 적응기간이 끝난 후 두 군으로 나누었다. 시판사료 (삼양유지사료, 원주, 0.005% 의 phytic acid를 함유)를 기본사료로 하고, 이 사료에 phytic acid (Sigma, Co., decasodium salt)를 0.2% 수준으로 첨가하여 자유급식하였다. 삼양유지의 자료에 따라 사료의 기본조성은 옥수수, 밀가루, 소맥피, 말분, 대두박, 어분, 당밀, 우지와 기타 비타민 및 미네랄로 구성되었으며 일반성분은 수분 11.0, 조단백질, 22.4, 조지방 4.3, 회분 6.9 및 N-free compound 55.4% 이었다. 또한 sodium의 함량을 조정하기 위하여 대조군에는 sodium phosphate를 첨가하였다. 실험식이 시작된 후 4개월 (120 일, 5개월령) 이 지나, 흰쥐를 희생시켰다. 혈액을 원심분리법으로 혈청을 얻어 냉동저장 하였다. 간장은 즉시 적출하여 지방의 분석을 위한 시료로 하였다.

다. 실험방법

1) 피틴산의 측정: 분말로 만든 시료에 0.2N HCl을 가한 후 1일간 추출하여 추출액을 Haug과 Lantzsch의 방법에 따라 피틴산 함량을 정량했다.

2) 미네랄 분석: 시료(쌀 또는 조식)은 질산-황산으로 가수분해하였다. 칼슘, 마그네슘, 아연과 철의 함량은 atomic absorption spectrophotometer(SpectraAA 300, Varian Co., Australia)로, 셀레늄의 함량은 형광광도계(LS-3, Perkin Elmer Co., Ltd., USA)를 이용하여

각각 정량했다. 혈청중 미량원소는 시판 측정용 kit를 사용하였다.

3) 지질분석: 실험동물을 희생시킨 후 신속히 간장을 적출한 다음, 생리식염수로 세척하고 -80℃에서 보관하였다. 혈청은 혈액을 수집하여 30분간 방치한 후 원심분리하여 획득하였다. 혈청 콜레스테롤, 고밀도 지단백질(HDL)-콜레스테롤, 중성지질과 글루코스농도는 각각 해당하는 진단용 kit(아산, 서울)를 이용하여 측정했다. 간장은 Folch 법으로 추출하여 감압 농축하여, 콜레스테롤은 Sperry와 Webb, 중성지질은 Fletcher의 방법, phospholipid는 Rouser등의 방법에 따라 각각에 따라 측정했다.

4) 지방산의 측정: 간장 인지질은 얇은막 크로마토그래프에 의해 총지질로 부터 정제했다. 획득된 지질들은 비누화하고 HCl-methanol(5:95, v/v)을 이용하여 메틸화했다. 주요지방산 들은 Silar 10C glass column 사용하여 가스 크로마토그래프(HP5890, USA)로 분리했다.

5) 과산화물함량측정: 혈청중 과산화물은 Yagi의 형광법, 간장중 과산화물은 Kikugawa 등의 비색법으로 측정하였다.

6) 분변중 담즙산함량측정: ethanol : water (1:1, v/v)으로 추출한 후 추출물들을 Van der Meer 등의 방법 에 따라 kit를 사용하여 효소법으로 분석하였다.

7) 단백질함량: 간장 균질물들의 단백질 함량은 Lowry법에 의해 측정했다.

8) Fatty acid synthase 활성측정: 흰쥐를 도살 후 간장을 취해 완충액으로 homogenate하여 초고속원심에 걸어 100,000 x g 의 상등액을 얻어 효소원으로 하였다.

9) lipofuscin 측정: 대뇌조직의 일정부분을 취하여 Folch 액을 첨가하여 1 분간 마쇄하여 동량의 물을 넣고 흔들어 원심분리 후 클로르포름층을 취해 Ex 380nm, Em. 460 nm 에서 형광도를 측정하여 강도로서 표시하였다.

10) GOT 및 GPT 측정: Sigma commercial kit를 이용하여 측정하였다.

11) 조직 중 phytic acid 의 확인: High voltage paper electrophoresis 를 이용하여 측정하였다. 일정량의 혈청 또는 간장을 취하여 homogenate 한 후 TCA 용액으로 제단백한 후 상등액을 paper 에 loading 하여 phytic acid 및 그 분해물의 존재여부를 확인 하였다.

12) Serum alkaline phosphatase 활성측정: Sigma commercial kit를 이용하여 측정하였다.

13) 통계처리: 통계분석은 실험결과들을 one-way analysis로 분석한 후 평균값들을 $p < 0.05$ 수준에서 LSD-test로 유의차를 검증하였다.

제 3절 결 과

1. 1년차: Phytate 섭취에 의한 생화학적대사지표의 변동

가. 현미의 Phytate 및 미네랄함량

Table 3은 강원도 지방에서 경작된 현미의 피틴산과 미네랄 함량을 보여주고 있다. 현미는 8.6~17.6 g/kg(Mean±SE, 12.6±0.19 g/kg)의 피틴산을 함유했다. 시료에서 진미와 상주는 화성에 비해 phytic acid 함량이 높았고 오대와 일품은 중간 값을 나타냈다. 현미 시료중 철의 함량은 1.6~14 mg/kg(7.4±0.25 mg/kg) 이었다. 쌀 품종 중 오대, 일품과 화성은 높은 철 함량을 나타냈다. 시료중 아연함량은 12.7~37.5 mg/kg(19.1±0.47 mg/kg)으로, 품종간 함량에 유의한 차이는 없었다. 칼슘함량은 64.8~146.5 mg/kg 범위로 평균함량은 111±2.2 mg/kg 이었다. 화성, 봉광, 추광품종은 다른 품종들에 비해 칼슘함량이 낮았다. 마그네슘 함량은 746~1,442 mg/kg(1,068±23.2 mg/kg) 이었다. 오대, 진미와 상주는 마그네슘 함량에 있어서 다른 품종들에 비해 높은 것으로 나타났다. 셀레늄 함량은 1.1~121.6 µg/kg의 범위로 폭넓은 차이를 나타냈다. 현미 시료 중 평균 셀레늄 함량은 38.3±2.98 µg/kg 이었다. 동진(sn=1)은 피틴산 13 g/kg, 칼슘 103 mg/kg, 마그네슘 812 mg/kg, 철 7.3mg/kg, 아연 21 mg/kg과 셀레늄 26 µg/kg을 각각 함유했다.

Table 3. The contents of phytic acid and minerals in brown rice

Cultivars	Phytic acid (g/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Se (µg/kg)
Odae	13±0.4 ^{abc}	117±4 ^a	1,140±42 ^a	8.0±0.27	20±0.7	29±4.6 ^a
Jinmi	13±0.4 ^{bc}	123±2 ^a	1,077±40 ^{ab}	6.5±0.46	19±0.8	45±3.2 ^{ab}
Sangju	13±0.5 ^c	113±1 ^a	1,188±37 ^a	7.1±0.59	18±1.6	34±2.8 ^{ab}
Ilpum	12±0.4 ^{ab}	104±2 ^{ab}	904±58 ^b	8.3±0.86	20±0.8	46±3.6 ^b
Hwasung	11±0.4 ^a	86±3 ^c	838±51 ^b	8.4±1.02	21±1.6	27±4.3 ^a
Bongkwang	11±0.8 ^a	86±6 ^{bc}	896±72 ^b	6.4±2.75	17±1.8	42±3.0 ^b
Chukwang	11±0.1 ^a	89±9 ^{bc}	942±42 ^b	6.7±0.75	16±0.2	50±3.0 ^b
Mean±SE	12.6±0.19	111±2	1,068±23	7.4±0.25	19.1±0.47	38.3±2.98

Mean±SE.

abcValues with different superscript letters denote significant difference(P<0.05)

나. 백미중 Phytate 와 미네랄함량

Table 4는 한국에서 경작된 백미시료 중 피틴산과 미네랄 함량을 보여주고 있다. 백미시료는 0.81~1.83 g/kg 범위의 피틴산을 함유했으며 평균값은 1.83 ± 0.18 g/kg 이었다. 백미시료 중 철, 아연, 칼슘과 마그네슘의 함량은 각각 2.1 ± 0.20 , 14.0 ± 0.66 , 45.6 ± 1.89 와 250 ± 1.7 mg/kg 이었다.

Table 4. The contents of phytic acid and minerals in polished rice

Items	Contents
Phytic acid(g/kg)	1.83 ± 0.18
Calcium(mg/kg)	46 ± 1.9
Magnesium(mg/kg)	250 ± 2
Iron(mg/kg)	2.1 ± 0.20
Zinc(mg/kg)	14 ± 0.7

Mean \pm SE

다. Phytic acid 투여효과

1) 흰쥐의 체중및 사료섭취량: Table 5는 실험기간중 각군의 식이섭취량 및 체중증가량 등을 보여주고 있으며 식이군간 현저한 차이는 없었다. 비록 상대적 간장무게(g liver/g body weight)가 다른 식이군에 비하여 P0.5군에서 높게 나타났지만 총 간장무게에서는 차이가 없었다. 혈청 GPT와 GOT의 활성에 유의한 차이는 보이지 않았다 (자료미제시).

Table 5. Growth parameters and feed intake in rats

Group	Initial body weight (g)	Weight gain (g/4 weeks)	Feed intake (g/day)	Liver Weight (g/100 g B.W.)
CON	96.6 ± 2.78	185.4 ± 4.50	15.5 ± 0.46	3.8 ± 0.09^a
P _{0.5}	96.6 ± 2.41	190.0 ± 9.06	16.4 ± 0.29	3.7 ± 0.13^a
P _{1.0}	96.2 ± 2.45	195.2 ± 11.70	16.8 ± 0.66	4.0 ± 0.07^b
P _{2.0}	96.5 ± 2.29	185.9 ± 8.03	15.4 ± 0.62	3.8 ± 0.07^a

Mean \pm S.E. of 6 rats.

^{ab}Values with different superscript letters are significantly different($p < 0.05$).

2) Phytic acid를 섭취한 흰쥐의 혈청지질및 glucose 농도: Table 6은 혈청중 지질과 glucose의 농도를 나타내고 있다. 혈청중 지질들의 농도는 P2.0군에서 다른 식이군들에 비하여 높은 경향을 보이고 있지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. Katayama는 콜레스테롤 무첨가 식이에 0.5%의 phytic acid 식이첨가는 탄수화물원으로써 sucrose를 먹인 Wistar 쥐에서 혈청중 지질농도를 효과적으로 저하시킨 반면 starch를 먹였을 경우에는 phytic acid의 지질농도 저하효과가 관찰되지 않았다고 보고하였다. 식이 콜레스테롤은 체내의 콜레스테롤 풀(pool)을 증가시키므로, 식이콜레스테롤첨가시 콜레스테롤대사에 대한 phytic acid의 기능은 변화될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 사료중 0.5~2.0%의 phytic acid 첨가는 콜레스테롤함유식을 투여한 흰쥐에서 혈청중 지질의 농도를 감소시키기에 충분하지 못할 지도 모른다. Jarwalla 등은 암컷 Fischer쥐에게 0.6%의 콜레스테롤을 함유한 식이에 9%의 phytic acid를 첨가하여 120일 동안 급식시켰을 때 혈청중 콜레스테롤 및 중성지질의 농도가 현저하게 감소했음을 관찰하였다고 보고한 바 있다.

Thompson 은 식이 phytic acid가 소화효소들의 활성을 저해함으로써 혈당을 감소시킬 수 있다고 보고 한 바 있다. 본 연구에서 phytic acid의 현저한 혈당저하 효과는 phytic acid를 2.0% 함유한 식이를 급식한 쥐들에서만 관찰되었다. 덧붙여, phytic acid의 효과적인 혈당저하 작용은 식이중 phytic acid의 함량이 2.0% 이상에서 가능할 것임을 시사한다.

Table 6. Concentration of serum lipids in rats

Group	TC (mg/100 ml)	HDL-C (mg/100 ml)	HDL-C/TC (%)	TG	PL (mg/100 ml)	Glucose
CON	74.7±4.33	45.7±2.63	61.4±2.26	88.9±11.44	154±7.9	113.9±4.73 ^a
P _{0.5}	77.8±7.90	46.8±2.86	62.3±5.36	81.6±13.17	153±8.7	113.7±3.05 ^a
P _{1.0}	83.4±6.92	50.5±3.79	61.4±3.53	87.8±16.61	154±5.8	116.9±4.75 ^a
P _{2.0}	69.6±2.71	47.3±2.43	68.3±3.61	74.8± 5.71	140±5.9	101.0±3.20 ^b

Mean±S.E. of 6 rats.

^{a,b}Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05).

3) Phytic acid 를 섭취한 흰쥐의 간장지질농도: Table 7은 간장 지질의 농도를 보여주고 있

다. 간장중 total cholesterol의 농도는 대조군에 비하여 phytic acid 급여군에서 현저하게 높았으며 특히, P0.5와 P2.0군에서 높았다. 그러나 triglyceride와 phospholipid의 농도에 있어서 각 실험군들간 현저한 차이는 없었다.

Table 7. Concentration of liver lipids in rats

Group	Total Cholesterol	Triacylglycerol (mg/g liver)	Phospholipids
CON	3.4±0.08 ^a	57.4± 6.62	34.4±1.64
P _{0.5}	3.9±0.17 ^b	52.5±10.00	34.6±0.60
P _{1.0}	3.8±0.16 ^{ab}	68.6± 5.19	34.3±0.69
P _{2.0}	3.8±0.12 ^b	62.7± 5.19	33.9±0.45

Mean±S.E. of 6 rats.

^{a,b}Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05).

4) 원취의 분변중 bile acid 함량: Bile acid의 분변중 배출은 Table 8 에서 보여주고 있다. 분변중 배출량은 P0.5와 P1.0군에서 더 높았다. 분변중 담즙산 분비는 대조군에 비하여 phytic acid 투여군에서 확실히 더 높게 나타났으며, 특히 Table 7 에서 보여진 바와 같이 간장중 cholesterol pool이 증가된 P0.5군에서 높았다. 식이cholesterol에 의한 cholesterol 7 α -hydroxylase의 증가된 활성은 담즙산의 합성을 증가시킨다.

Table 8. Amount of bile acids and weight of feces in rats

Group	Bile acids (μ moles / day)	Fecal weight (g / day)
CON	8.5 ± 1.49 a	1.2 ± 0.08 ab
P _{0.5}	25.9 ± 2.48 b	1.4 ± 0.21 a
P _{1.0}	18.4 ± 2.45 b	1.4 ± 0.18 a
P _{2.0}	14.2 ± 1.41 c	1.2 ± 0.19 b

Mean±S.E. of 6 rats.

^{a,b}Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05).

식이 phytic acid에 의한 간장 cholesterol의 축적은 P2.0군에서 혈청 HDL-/total cholesterol의 비율이 약간 증가함이 관찰되었기 때문에 간장으로의 혈청 LDL-cholesterol의 유입이 증가된 후 관찰된 일시적인 현상일 지도 모른다. 이러한 결과는 증가된 LDL의 이화 속도는 이차적으로 분변중 sterol 분비를 증가시킬 수 있음을 시사한다. 또 한가지의 가능성은 간장으로부터 혈액으로 very low density lipoprotein(VLDL)의 분비가 식이 phytic acid에 의해 저지되어 간장에서 cholesterol pool이 상승되었을 지도 모른다는 것이다. 본 실험에서 쥐들은 10시간 동안 절식시킨 후 희생되었다. 이러한 조건에서 획득된 혈청 cholesterol은 VLDL cholesterol의 미묘한 변동을 충분히 반영하기 어려울 지도 모른다.

Table 9. Concentration of serum minerals in rats

Group	Ca (mg/100ml)	Mg	TIBC* (μg /100ml)
CON	9.8±0.14	2.3±0.07	565.6±10.06 ^a
P _{0.5}	10.2±0.36	2.2±0.04	645.5±28.50 ^b
P _{1.0}	9.9±0.24	2.3±0.10	641.2±11.64 ^b
P _{2.0}	9.6±0.29	2.4±0.13	594.8±14.02 ^{ab}

Mean±S.E. of 6 rats.

^{ab}Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05).

- 5) 혈청 미네랄농도: Table 9 는 혈청에 있어서 Ca, Mg과 total iron capacity(TIBC)의 농도를 요약하고 있다. 혈청에 있어서 Ca과 Mg의 함량은 군간 유사했다. TIBC는 P0.5와 P1.0에서 대조군에 비하여 높게 나타났으며 P2.0군은 중간값을 보이고 있다. 혈청중 철의 대부분은 transferrin 또는 ferritin과 같은 단백질에 결합된 복합형으로 존재한다. TIBC의 높은 수치는 혈청에 있어서 단백질과 결합하고 있는 철의 부족과 밀접하게 연관이 있으므로 본 연구에서 철의 생유용성 저하는 식이성 phytic acid에 기인한다는 것을 입증하는 것이다.
- 6)간장 미네랄농도: Table 10은 간장의 Ca, Mg, Zn과 Fe의 농도를 보여주고 있다. 철을 제외한 나머지 미네랄들의 함량에 있어서 현저한 변화는 없었다. 철의 함량은 P0.5와 P2.0군에

서 현저하게 낮았다. 이러한 경향들은 혈청에서 또한 관찰되었다. 대부분의 동물에서 간장은 현저하게 높은 철의 보유능력을 가지고 있으며 적혈구 세포들이 생산되어질 때 철을 방출한다. TIBC의 증가는 phytic acid가 함유된 식이로 급식된 쥐들에 있어서 간장중 철의 함량 감소에 기인되어질 수도 있음을 보여주고 있다. 비록 이전의 연구들이 식이 phytic acid에 의한 조직 Zn 의 감소를 나타냈을 지라도 간장에서 그와 같은 영향은 관찰하지 못했다. 아연의 결핍은 저콜레스테롤혈증을 유발하는 반면 철의 결핍은 그 반대되는 효과를 갖고 있다는 것은 흥미로운 것이다. 만약 식이 phytic acid가 유사한 정도로 두 이온들의 흡수를 저해한다면 지질 대사에 연관된 식이 phytic acid의 효과는 Zn과 Fe의 다른 작용에 의해 상쇄되어질 수도 있다. 이러한 상황에서 식이성 phytic acid와 공존하는 Fe와 Zn의 상호작용을 밝히는 것은 여전히 명백해져야 할 것으로 남는다. 철의 결핍은 아동들과 여성들에 있어서 중요한 영양적 문제중 하나이다. 심한 빈혈증은 철의 낮은 흡수 또는 생유용성과 일치한다.

Table 10. Concentration of liver minerals in rats

Group	Ca	Mg	Fe	Zn
		($\mu\text{g} / \text{g}$)		
CON	59.8 \pm 1.29	225.8 \pm 3.99	60.2 \pm 1.49 ^a	29.7 \pm 0.64
P _{0.5}	59.6 \pm 2.04	227.1 \pm 2.81	51.7 \pm 2.55 ^{bc}	29.2 \pm 1.08
P _{1.0}	59.8 \pm 0.86	219.1 \pm 1.69	58.4 \pm 2.61 ^{ab}	28.6 \pm 1.08
P _{2.0}	59.7 \pm 1.15	220.5 \pm 1.50	51.1 \pm 3.01 ^c	28.6 \pm 0.78

Mean \pm S.E. of 6 rats.

^{ab,c}Values with different superscript letters are significantly different($p < 0.05$).

결론적으로 흰쥐에 phytic acid의 투여는 혈청지질농도에는 현저한 영향을 미치지 않고 간장중 철이온의 감소와 혈청 TIBC의 증가를 유발시켰다. 혈당저하효과는 단지 2.0%의 phytic acid를 함유한 식이로 급식된 동물에서 관찰되었다. 이러한 결과들은 한국에서 경작된 쌀에 함유된 량과 대등한 량의 식이성 phytic acid는 철의 생유용성을 감소시키므로 저피틴산 쌀 품종의 개발은 인간에서도 철의 생유용성을 증진시키는데 도움을 줄 것이다.

2. 2년차 : Phytate 가 생체대사에 미치는 영향

가. 식이섭취량 및 체중증가량

Phytic acid의 함량을 달리한 식이를 섭취한 연령별 식이군 사이의 식이섭취량, 체중증가량 및 상대적 간장무게는 통계적으로 현저한 차이를 나타내지 않았다 (Table 11). 그러나 체중증가량과 상대적 간장 무게는 식이와는 무관하게 어린 쥐들에 비교하여 나이드는 쥐들이 더 낮았다. 혈청중 GOT와 GPT 활성은 식이 또는 연령에 기인한 차이를 볼 수 없었다. 이러한 결과는 phytic acid 섭취가 의견상 흰쥐의 성장에 영향이 없음을 시사한다.

Table 11. Body growth and food intake of experimental rats

Group	Initial body weight (g)	Weight gain (g/4weeks)	Food intake (g/day)	Liver weight (g/100 b.w.)
Young CON	185.9±3.24	147.4±4.79	24.3±0.49	3.7±0.11
P _{0.5}	184.9±2.56	147.7±6.78	24.7±0.83	3.7±0.11
P _{2.5}	184.8±2.57	149.8±5.31	24.1±0.57	4.0±0.20
Adult CON	536.1±11.98	20.1±5.97	25.3±0.71	2.8±0.11*
P _{0.5}	535.1± 9.72	21.7±3.99	24.3±0.74	2.8±0.08*
P _{2.5}	535.1±10.06	11.3±2.47	25.4±0.78	2.9±0.10*

Mean±S.E. of 8 rats.

*Significantly different(p<0.05) to the corresponding young rats.

나. 지질농도의 변화: 혈청 및 간장지질은 체내의 지질대사의 변동을 잘 반영한다. Table 12와 13은 혈청 및 간장의 지질농도를 나타내고 있다. 흥미롭게도 young군에서는 혈청콜레스테롤 및 중성지방의 농도가 감소하고 있으나, Adult 군에서 동일한 효과는 관찰되지 않았다. 그러나, 나이에 상관없이 간장콜레스테롤농도는 phytate 섭취에 의해 증가한다는 것을 보여주고 있다. 따라서, 혈청콜레스테롤농도의 감소는 phytate 섭취에 의해 간장으로부터 VLDL합성의 감소 또는 혈액으로 지방단백질의 분비가 억제되고 있음을 강력하게 시사하여 준다. 이러한 측면에서 성인의 경우 phytate 섭취에 의해 혈액지질농도의 감소는 기대하기 어려우며 오히려 간장의 콜레스테롤농도만 상승시키는 결과를 유발할 가능성이 높다. 한편

간장 fatty acid synthase 에 대한 phytic acid 섭취의 효과는 없었으나, aging 에 따라 효소 활성은 감소하였다. 이러한 결과는 나이가 들수록 식이의 영향이 감소하고 있음을 시사한다.

Table 12. Concentration of serum lipids in young and adult rats.

Group	TC	TG		HDL-C	HDL-C/TC	Glucose
		(mg/dl)				
Young	CON	75.7±7.02	58.9± 7.37	46.6±4.97	61.6±3.26 ^{ab}	104.5±3.50
	P _{0.5}	69.8±2.90	45.4± 6.57	39.4±2.03	56.9±2.16 ^a	99.6±4.71
	P _{2.5}	60.9±5.77	42.8± 2.44	37.8±1.51	66.6±3.06 ^b	105.9±2.71
Adult	CON	81.9±2.65	62.8±14.64	42.8±2.88	53.2±2.28	108.1±4.75
	P _{0.5}	80.7±5.40	68.4±11.16	45.8±3.43	56.6±1.22	110.4±3.26
	P _{2.5}	84.0±5.91 [*]	71.8±11.51 [*]	48.9±2.99 [*]	57.9±2.32 [*]	102.8±4.20

Mean±S.E. of 8 rats.

^{ab}In age-matched rats values in a same column without superscript letters denote significant difference(p<0.05).

^{*}Significantly different(p<0.05) to the corresponding young rats.

Table 13. Concentration of liver lipids in young and adult rats

Group	Total Cholesterol		Triacylglycerol	
	Young	Adult	Young	Adult
	(mg/g liver)			
CON	2.8±0.11 ^a	2.3±0.30	23.0±3.15	20.8±1.64
P _{0.5}	3.2±0.37 ^a	2.8±0.18	23.7±3.97	24.3±4.41
P _{2.5}	3.9±0.18 ^b	2.9±0.24 [*]	22.6±3.79	21.1±2.17

Mean±S.E. of 8 rats.

^{ab}In age-matched rats values, different superscript letters denote significant difference(p<0.05).

^{*}Significantly different(p<0.05) to the corresponding young rats.

다. 미량원소농도

미네랄은 흡수되어 일단 간장으로 이동되어지므로, 간장은 미네랄을 일시적인 또는 장기적인 미네랄의 저장기관이며, 체내 미량원소의 pool 이 된다. 그러므로 간장의 미네랄농도는 미네랄의 흡수정도를 반영할 것이다. 혈액중 mineral 함량에는 커다란 차이가 없었다 (Table 14).

Table 14. Concentration of serum minerals in young and adult rats

Group		Ca	Total iron	UIBC	TIBC	TI/TIBC
		(mg/dl)		(μ g/dl)		(%)
Young	CON	7.8 \pm 0.29	135.5 \pm 10.25	473.0 \pm 5.14	615.8 \pm 8.42	22.0 \pm 1.54
	P _{0.5}	9.6 \pm 0.33	135.9 \pm 12.18	475.5 \pm 2.83	618.4 \pm 12.80	20.5 \pm 1.81
	P _{2.5}	11.2 \pm 1.46	153.6 \pm 16.33	476.3 \pm 3.05	622.3 \pm 15.53	21.8 \pm 1.50
Adult	CON	9.0 \pm 0.23*	129.0 \pm 12.57	480.3 \pm 3.26	614.3 \pm 14.85	22.2 \pm 1.09
	P _{0.5}	9.5 \pm 0.26	138.0 \pm 7.90	477.0 \pm 2.80	620.8 \pm 8.95	25.4 \pm 2.82
	P _{2.5}	8.5 \pm 0.16	113.1 \pm 15.43	474.3 \pm 2.75	585.3 \pm 14.84	21.0 \pm 1.34

Mean \pm S.E. of 8 rats.

*Significantly different(p<0.05) to the corresponding young rats.

Table 15. Concentration of liver minerals in young and adult rats

Group		Ca	Cu	Fe	Mg	Zn
				(μ g / g)		
Young	CON	44.5 \pm 2.12	6.1 \pm 0.10	93.7 \pm 4.93	231.5 \pm 6.83	29.0 \pm 0.94
	P _{2.5}	39.6 \pm 1.38	6.8 \pm 0.79	89.6 \pm 4.44	227.4 \pm 7.38	29.3 \pm 1.12
Adult	CON	42.6 \pm 1.43	8.8 \pm 1.06*	179.4 \pm 9.59*	238.5 \pm 6.66	31.7 \pm 0.85
	P _{2.5}	40.5 \pm 1.84	8.8 \pm 0.60*	165.2 \pm 8.25*	245.6 \pm 5.05	31.7 \pm 0.67

Mean \pm S.E. of 8 rats.

*Significantly different (p<0.05) to the corresponding young rats.

Table 15는 간장중 미네랄함량을 나타낸 것으로 칼슘 및 철의 함량은, 나이에 관계없이 phytate 섭취에 의해 감소하고 있음을 보여준다. 특히 young 군에서 칼슘함량은 1개월 투여

시 약 10 %의 감소를 나타내고 있다. 이는 성장시기 동일한 량의 칼슘을 섭취하여도 phytic acid 섭취량의 증가는 간장중 저장된 칼슘농도의 감소를 유발한다는 것을 보여주고 있다. 또한 adult 군에서 young 군보다 철의 감소가 유의하게 나타나고 있다. 본 결과는 수컷동물에서 얻었으나, 암컷일 경우 이러한 결핍현상은 더욱 뚜렷할 것으로 생각된다.

Table 16 은 혈청중 Alkaline phosphatase 효소활성을 보여준다. 혈액중 이 효소의 활성증가는 부분적으로 뼈중 Ca이 유리되고 있음을 시사한다. 이 효소의 활성증가는 young 군의 0.5% phytic acid 섭취군에서 분명하였으며, 이는 간장pool 의 감소와도 일치된 결과를 보여준다 하겠다.

Table 16. The activities of serum alkaline phosphatase in young and adult rats

Group	Young	Adult
	K-A unit	
CON	30.2±2.86 ^a	23.0±2.60
P _{0.5}	37.4±4.10 ^b	19.8±1.96*
P _{2.5}	32.2±2.40 ^{ab}	23.3±3.05*

Mean±S.E. of 8 rats.

^{ab}In age-matched rats, different letters denote significant difference(p<0.05).

*Significantly different(p<0.05) to the corresponding young rats.

라. Phytic acid 흡수에 대한 효과

Phytic acid 를 섭취한 흰쥐에서 간장 및 혈청의 단백질을 제거한 후 High voltage paper electrophoresis 를 통하여 phytic acid 의 존재를 확인하였으나, 검출되지 않았다. Phytic acid 는 강한 음이온을 갖고 있어 그 자체로는 흡수되지 않는 것으로 생각된다. 따라서 phytic acid 의 섭취는 일차적으로 소화관내에서 다른 양이온성물질과 결합하여 이들물질의 소화나 흡수에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 세포수준에서 phytic acid는 일부 세포내로 흡수되는 것으로 알려져 있다.

마. 항산화제에 미치는 효과

In vitro 실험에서 phytate 는 항산화효과가 있는 것으로 보고되어 왔다. 본 실험에서는 phytate 섭취시 실제로 체내에서 항산화효과가 발현되는지를 검토하였다 (Table 17). 나이와 더불어 간장이나 혈청중 TBA-like substance 는 상승하는 효과를 나타내었다. 그러나 phytate 투여에 의한 TBA 값의 저하는 변화하지 않았다. 이는 *in vitro*와 *in vivo* 상에서의 실험결과를 잘 보여주는 것으로 생각되며, 실제로 생체내에서는 phytic acid 의 항산화효과는 발휘되지 않는 것으로 예측된다. 이미 위에서 언급한 바와 같이 phytic acid가 체내로 흡수되지 않는다고 하면, phytate 섭취에 의한 유의한 효과는 기대할 수 없다고 결론지을 수 있다. 그러나, 장내에서 free iron의 흡수가 phytate에 의해 저해된다면, 체내에서 철이온에 의해 일어날 수 있는 산화효과의 억제가능성은 있다. phytic acid의 모든 분해 생성물들이 *in vitro* 항산화 활성을 보이지는 않는 듯 하다. 결과적으로 이번 연구에서 보여진 바와 같이 식이 phytic acid의 *in vivo* 항산화 활성은 미비한 것으로 생각된다. Terao 등은 식이 phytic acid가 소화관내에서 부분적으로 지질과산화를 억제할지 모른다고 지적한 바 있다.

Table 17. Peroxidation value of serum and liver in young and adult rats

Groups	liver		serum	
	Young (nmole/mg protein)	Adult	Young	Adult (nmole/ml)
CON	0.79±0.170	1.26±0.239	6.4±0.78	8.3±2.18
P ₀₅	1.00±0.156	1.28±0.281	6.3±0.87	7.9±0.61
P ₂₅	0.67±0.222	1.01±0.220	7.4±1.38	8.0±0.75

Mean±S.E. of 8 rats

바. Lipofuscin 생성에 미치는 효과

Lipofuscin 은 흔히 노반이라고 부르는 지방-단백질복합체로 나이가 들면서 피부나 뇌조직

에 침착하며, 일종의 aging marker 로 생각되고 있다. Table 18에서 보는 바와 같이 어린쥐나 성숙한 쥐의 뇌에서 phytate 투여에 의해 어떠한 효과도 발휘하지 못하였다.

Table 18. Lipofuscin pigments of brain in young and adult rats

Group	Young and Adult	
	Young	Adult
	(relative fluorescence)	
CON	0.58 ± 0.057	0.58 ± 0.028
P _{0.5}	0.65 ± 0.030	0.64 ± 0.023
P _{2.5}	0.61 ± 0.040	0.56 ± 0.034

Mean ± S.E. of 8 rats.

사. 분변 스테로이드배설에 대한 효과

Table 19 에서 보여진 바와 같이 같은 나이의 쥐들의 분변량에 있어서 식이에 의해 유도된 차이는 없었다. 이번 실험에서 우리는 시료 분석을 감소시키기 위하여 P_{0.5}군의 분변중 담즙산 분비를 정량하지 않았다. 분변량은 control 식이를 급여한 쥐들에서 나이와 상관없이 대등하였으나 P_{2.5}군에서는 adult 군이 young 군에 비하여 높은 분변량을 보였다. 같은 나이의 군내에서는 분변중 담즙산의 현저한 차이는 없었다. 그러나 담즙산배설량은 나이에 의존하여 증가하였다.

Table 19. Fecal bile acids excretions in young and adult rats

Group	Fecal weight		Bile acids	
	Young	Adult	Young	Adult
	(g/day)		(μ mol/day)	
CON	3.53 ± 0.236	3.96 ± 0.287	24.3 ± 1.97	30.2 ± 0.99*
P _{2.5}	3.56 ± 0.123	4.28 ± 0.309	25.6 ± 1.79	30.1 ± 3.41

Mean ± SE of 8 rats

*Significantly different (p < 0.05) to the corresponding young rats.

3. 3 년차 : 장기간 Phytate 투여시 대사계의 adaptation 효과

가. 체중 및 간장무게의 변화

Table 20은 조제된 사료로 4개월간 투여시 관찰된 체중변화 및 간장무게를 나타낸 것으로 phytate 투여는 흰쥐의 외견상 성장에 영향을 주고 있지 않음을 보여주고 있다. 식이섭취량이나 간장무게에 유의한 차이는 없었다. 사료중 0.2% 정도의 phytic acid 첨가율은 일반적으로 우리가 섭취하는 백미중 함유되어 있는 함량의 비율이다. 이러한 점으로부터 phytic acid에 의한 체중조절효과는 없는 것으로 생각된다.

Table 20. Body growth and food intake of experimental rats

Groups	Initial body weight	weight gain	Food intake	Liver weight
	(g)	(g/4month)	(g/day)	(g/100 b.w.)
Basal	101.6±3.50			5.05±0.160
CON	102.3±3.54	360.8±10.32	27.3±0.97	3.07±0.067
EXP	98.9±2.13	366.2±09.54	29.0±0.74	3.02±0.045

Mean±S.E. of Mean ± SE of 7 rats

나. 혈청 지질농도에 미치는 효과

혈청콜레스테롤농도는 1개월과 5개월령 사이에 현저한 상승이 있었으며, phytic acid를 섭취한 군은 정상적인 군에 비하여 유의한 상승이 있었다. 중성지질, HDL-cholesterol 농도, glucose 농도에 유의한 차이는 없었다. 이러한 결과로부터 간장콜레스테롤의 축적은 궁극적으로 혈청콜레스테롤농도를 상승시킬 수 있음을 보여주며 phytic acid 농도의 감소는 지질 대사개선에 유효한 효과를 낼 것으로 사료된다 (Table 21).

Table 21. Concentration of serum lipids in rats fed experimental diets

Group	TC	TG (mg/dl)	HDL-C	HDL-C/TC (%)	Glucose (mg/dl)
Basal	97.0±7.74 ^a	113.3±11.57 ^a	23.7±2.36 ^a	24.6±2.25 ^a	156.8±2.47 ^a
Control	135.4±5.22 ^b	86.3± 8.31 ^{ab}	44.2±1.60 ^b	31.8±0.98 ^b	122.8±1.44 ^b
P0.2%	154.2±5.13 ^c	88.5±14.60 ^b	48.1±2.89 ^b	31.3±1.94 ^b	120.8±2.55 ^b

Mean±S.E. of 7 rats.

^{ab}Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

다. 간장 지질농도에 미치는 효과

지금까지 진행된 연구에서 간장의 콜레스테롤농도는 phytate 투여시 현저하게 상승하는 효과를 발휘하였다. Table 22 에서 보는 바와 같이 간장콜레스테롤농도에 유의한 차이는 없었다. 그러나 aging 에 의해 콜레스테롤농도는 유의하게 상승하였다. 이 같은 현상은 간장중성지질에서도 확인되었다. 이러한 결과로부터 장기간 phytic acid 섭취는 혈청콜레스테롤농도를 상승시킬 수 있음을 보여주고 있다.

Table 22. Concentration of liver lipids in rats

Group	Total Cholesterol (mg / g liver)	Triacylglycerol
Basal	2.17±0.078 ^a	4.42±0.241 ^a
Control	2.74±0.077 ^b	9.87±0.574 ^b
phytic acid	2.86±0.053 ^b	10.04±0.576 ^b

Mean±S.E. of 7 rats.

^{ab}Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

라. 혈청중 철 및 칼슘농도에 미치는 효과

Phytic acid 는 장내에서 Fe^{2+} 또는 Ca^{2+} 등 2가 양이온과 결합함으로써 이들 미네랄의 흡수를 억제함으로써 미네랄의 생체이용율을 감소시킨다. Table 23은 4개월간 phytic acid를 0.2 % 수준으로 투여시 철 및 칼슘의 농도를 나타내고 있다. 철 및 칼슘의 농도는 통계학적으로 대조군과 유의한 차이는 관찰되지 않았으나, 총철의 경우 phytate 투여군에서 약 7% 감소를 보이며, 칼슘의 경우는 거의 유의한 차이를 보이고 있지 않았다. 또한 TIBC 는 phytic acid 투여에 의해 감소하는 결과를 나타내었다. 결과적으로 phytic acid 투여군에서 TI/TIBC 비의 감소는 TIBC 의 감소에 기인되었다. UIBC 역시 대조군에서 높았다.

Table 23. Concentration of serum minerals in rats

Group	TI	UIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	TIBC	TI/TIBC (%)	Ca (mg/dl)
CON	160.0 \pm 8.06	271.1 \pm 10.03	431.1 \pm 17.68	37.0 \pm 0.54	9.60 \pm 0.150
PHY	148.6 \pm 10.19	229.5 \pm 22.41	378.0 \pm 24.72	39.8 \pm 2.92	9.39 \pm 0.089

Mean \pm S.E. of 7 rats.

마. 조직중 과산화지질농도의 변화

Table 24 는 4개월 간 투여한 동물의 간장 및 혈청의 TBA 반응물질을 측정한 것이다. 보는 바와 같이 aging 에 의해 과산화물가의 상승이 양 조직에서 관찰되나 phytic acid 투여에 의한 TBA반응물질의 농도에 차이는 없었다. 이와 같은 결과는 비록 phytic acid 가 in vitro 상에서 항산화효과를 발휘하나 in vivo 상에서 이와 같은 효과는 발휘하지 못하는 것으로 생각된다. 특히, phytic acid의 흡수는 아직까지 정확하지 않으며, 이러한 흡수의 장애로 phytic acid에 의한 유효한 효과는 기대하기 어려운 것으로 사료된다.

Table 24. Peroxidation value of liver and serum in rats

Group	Liver (μ mol/g)	Serum (nnol/ml)
Basal	0.233 \pm 0.0309 ^a	2.895 \pm 0.2364 ^a
Control	0.294 \pm 0.0392 ^b	3.983 \pm 0.1093 ^b
Phytic acid	0.289 \pm 0.0404 ^b	3.897 \pm 0.3028 ^b

Mean \pm S.E. of 7 rats.

^{ab}Values with different superscript letters are significantly different($p < 0.05$)

바. 간장기능에 미치는 효과

Table 25는 4개월간 phytic acid 섭취시 간장기능을 확인하기 위하여 혈청 GOT 및 GPT 활성을 측정 한 것이다. 보는 바와 같이 phytate 투여에 의해 유의한 변화는 없었다. 오히려 효소활성은 phytate 투여군에서 낮은 경향을 보이고 있다.

Table 25. Activities of serum GOT and GPT in rats

Group	GOT	GPT
	(Karmen unit)	
CONTROL	103.1 \pm 6.14	40.3 \pm 1.92
PHYTIC ACID	92.0 \pm 4.70	34.7 \pm 1.94

Mean \pm S.E. of 7 rats.

^{ab}Values with different superscript letters are significantly different($p < 0.05$)

사. 대퇴골의 무게 변화

4개월이 지난 후 실험한 흰쥐의 대퇴골을 취하여 무게를 측정하였으나, 양군간 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 0.2% 정도의 phytic acid 섭취와 흰쥐의 섭취요구량에 충족되는 Ca 공급시 뼈 성장에는 큰 차이가 없음을 보여준다 (대퇴골의 무게: 대조군, 1.70 \pm

0.033 g, phytic acid 섭취군, 1.71 ± 0.04 g).

결론적으로 5개월간 한국인이 섭취하는 수준으로 phytic acid를 원쥐에 투여하였을 때, 체중감소의 효과는 없었다. 오히려 Phytic acid 투여에 의한 극적인 변화는 phytic acid 투여에 의한 혈청콜레스테롤농도의 상승이다. 지금까지 1개월 phytic acid 투여시 부분적인 혈청콜레스테롤농도의 감소와 간장콜레스테롤농도가 증가하였다. Phytic acid는 이유하기 시작하면 시작되면 일생동안 섭취하므로 인간에게 있어서 장기간 phytic acid 를 섭취시 단기간 관찰되는 효과와는 다른 효과가 나타나고 있음을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 부터 phytic acid 섭취는 혈청콜레스테롤농도의 상승을 가져와, 생체내의 유익한 인자로 간주하기 어렵다. 또한 장기 투여시 간장이나 혈청의 과산화정도에 차이가 없어 항산화효과는 기대할 수 없었다. 반면 혈청중 Ca 과 철이온은 phytic acid 투여에 의해 감소하는 경향을 보이고 있다. 장기간의 투여실험에서 phytic acid는 antinutrient factor 의 성질이 강하다는 것을 결론지을 수 있었다.

제 4 절 고 찰

본 연구는 저피틴산쌀 종자를 개발의 한 project로서 식량원에서 phytic acid 의 함량을 감소시켰을때, 생리영양학적으로 나타날 수 있는 효과를 검토할 목적으로 시행되었으며, 총 3년간에 걸쳐 수행되었다. 이러한 결과를 중심으로 고찰하고자 한다.

1. 현미, 백미, phytic acid 와 미네랄

한국에서 생산된 현미의 평균 피틴산함량은 12.6 g/kg (dry basis) 이었으며, 품종과 생산되는 지역에 따라 그 함량이 변화한다는 것을 확인할 수 있었다. 즉 강원도에서 주로 재배되는 오대, 진미는 다른 품종들에 비해 훨씬 더 많은 피틴산을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 더불어, 강원도 해안지역에서 경작된 현미는 내륙지역에서 경작된 것 보다 많은 피틴산을 함유하는 것으로 보인다.

한편, 현미 중 철, 아연, 칼슘과 마그네슘의 함량은 품종에 의존하여 달라짐을 볼 수 있었다. 이들 미네랄함량은 한국에서 이미 보고된 결과와 유사하지만 칼슘 함량은 내륙지역에서 보다 해안지역에서 경작된 벼 품종들이 더 높게 나타났다. 재배 지역에 따른 칼슘함량의 차이는 아마도 토양상태를 반영한 것으로 생각된다. 본 연구에서 현미 품종들의 피틴산 함량과 미네랄 함량 사이에서 어떠한 상관관계는 관찰할 수 없었다. 셀레늄 함량은 1.1~121.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 범위로 시료에 따라 큰 차이를 보였다. 셀레늄 함량에 있어서 품종간에는 현저한 차이를 보인 반면 경작 지역에 따른 차이는 나타나지 않았다. 지금까지 한국에서 경작된 현미의 셀레늄 함량에 관한 유용한 수치는 없었다. 일본에서 재배된 현미의 셀레늄함량은 30~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 알려져 있어, 우리의 결과와 비슷한 값을 나타낸다.

한편, 춘천 곡물시장에서 구입한 백미 중 피틴산 함량은 위에서 언급한 현미의 15% 수준이었다. 그러나 시료로 사용된 백미들이 본 연구에서 사용된 현미로부터 얻어진 것이 아니기 때문에 피틴산 함량이 도정에 의해 정확하게 어느 정도 감소되는지는 확실하지 않다. 따라서 우리는 별도로 벼 두 시료를 이용하여 도정중 phytic acid 함량의 거동을 확인하였다. 표는 두 점의 시료를 현미, 7분도, 9분도, 백미상태로 도정된 것을 직접 정미소로 부터 구하

여 본 실험실에서 행한 것이다.

벼의 도정에 따른 phytic acid 함량의 거동

시 료	피틴산 (%)	변 화 율 (%)
현 미	1.05	100.0
7 분 도	0.47	45.3
9 분 도	0.27	25.6
백 미	0.20	19.2

쌀 중 대부분의 phytic acid는 쌀의 호분층에 존재하는 것을 알 수 있으며, 도정에 의해 80% 정도 감소됨을 알 수 있으며, 우리가 이미 제시한 결과와 비슷한 수준이다. 이러한 결과로 부터 한국인이 하루 쌀로 부터 섭취되는 phytic acid의 함량을 계산할 수 있다. 즉, 1995년 국민영양조사보고서에 의하면 국민 1인당 280 g 의 쌀을 소비하며 이는 약 560 mg 의 phytic acid를 섭취하는 꼴이 된다. 별도로 이미 phytic acid 함량이 알려진 곡물을 중심으로 한국인의 phytic acid 섭취량을 계산하면 약 1,175 mg 정도가 되며, 쌀은 그중 약 45% 내외를 차지하여 한국인에 있어 쌀은 phytic acid의 주요공급원이 된다. 그러므로 일단 한국인의 phytic acid의 섭취량을 감소시킬 목적이라면 쌀의 phytic acid 함량을 감소시키는 것이 우선적인 요소가 될 것이다.

도정에 의해 phytic acid의 함량이 감소될 때 미네랄의 감소는 얼마나 될 것인가? 우리의 실험결과로 설사 phytic acid가 쌀의 호분층에서 Ca과 결합되어 있다 할지라도 그 량은 현미 전체의 60% 정도로 예상되나, phytic acid의 경우는 80%를 상회한다. 즉, phytic acid를 감소시킬때 mineral 의 감소비율은 크지 않다는 것을 시사한다.

그러므로, 최근에 in vitro에서 피틴산의 바람직한 효과들이 보고되었을 지라도 식이중의 피틴산에 의한 미네랄들의 생유용성 저하는 한국인들을 포함하여 주식으로서 곡류를 섭취하는 사람들에게 현저한 영양적 문제가 되며, 유용한 미네랄들을 높은 수준으로 유지하고 피틴산함량이 낮은 벼 품종을 개발은 한국인들의 미네랄 영양상태를 개선하는데 크게 기여

할 것이다.

2. Ca 과 phytic acid

식품중에 존재하는 Ca은 유리상태 또는 oxalate 나 phytate 와 복합체를 형성하고 있어 Ca 은 존재하는 형태에 따라 그 이용도가 다른 것으로 알려져 있다. 예로 들면, 시금치는 높은 Ca 함량을 나타내나, oxalate 와 결합하고 있어, 그 이용도는 5% 정도이다. 한편 사람에게 있어 대두중 함유된 phytate 와 Ca 함량과 Ca 생체이용도를 검토하여 보면,

$Y = -0.042X + 46$ 의 식이 유도된다 (여기에서 Y 는 Ca 의 흡수율, X = phytic acid 량 (mg) 을 나타낸다). 이 결과로 부터 콩에서의 Ca 흡수율은 phytic acid 함량과 반비례하는 것을 알 수 있으며, 현재 한국에서 생산되는 쌀 (0.2% phytic acid 함량으로 계산시) 을 섭취시 Ca 흡수율은 약 29% 정도이다. 만약 쌀중의 phytic acid 함량을 0.05 % 수준으로 감소시킬수 있다면 Ca 흡수율은 약 36% 수준으로 향상시킬 수 있다.

95년 국민영양조사보고서로 부터 한국인의 평균 Ca 섭취량은 하루 약 530 mg 으로 권장량 700 mg의 75% 수준에 머무르고 있다. 따라서 계획하는 저 피틴산쌀을 섭취한다면(Ca 흡수율을 30 % 로 계산하면), 약 110mg 의 Ca 을 부가적으로 섭취하는 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 측면에서 쌀중 phytic acid 함량의 감소는 Ca 의 bioavailability 를 향상시키는 중요한 인자임을 알 수 있다.

3. 생체대사와 phytic acid

흰쥐를 이용한 실험에서 혈청중 지질들의 농도는 phytic acid 투여군에서 다른 식이군들에 비하여 낮은 경향을 보이고 있지만, 이러한 감소는 간장중 cholesterol 의 축적을 가져오는 결과를 보이고 있다. 사료중 콜레스테롤의 첨가는 체내의 콜레스테롤 풀(pool)을 증가시킬 가능성이 있기 때문에 콜레스테롤대사에 대한 phytic acid의 효과는 변화될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 식이중 0.5~2.0%의 phytic acid 첨가는 콜레스테롤을 함유한 식이를 먹인 쥐에서 혈청중 지질의 농도를 감소시키기에 충분하지 못했을 것으로 생각된다.

Jarwalla 등은 암컷 Fischer쥐에게 0.6%의 콜레스테롤을 함유한 식이에 9%의 phytic acid를 첨가하여 120일 동안 급식시켰을 때 혈청중 콜레스테롤 및 중성지질의 농도가 현저하게 감소했음을 관찰하였다고 보고한 바 있다.

Phytic acid 투여군에서 bile acid의 분변중 배설량은 증가하였으며, 이는 간장중 축적된 cholesterol에 의해 담즙산합성계효소의 활성화를 유발한 것으로 사료된다. 식이성 phytic acid에 의한 간장 cholesterol의 축적은 동시에 혈청 HDL-/total cholesterol의 비율을 약간 증가시키므로, 간장에서 혈청 LDL-cholesterol의 유입이 증가된 후 관찰된 일시적인 현상일 지도 모른다. 이러한 결과는 증가된 LDL의 이화속도가, 이차적으로 분변중sterol 분비를 증가시킬 수 있음을 시사한다.

Thompson 등은 식이성 phytic acid가 소화효소들의 활성을 저해하여 결과적으로 인간뿐만 아니라 동물에 있어서도 혈당을 저하시킬 수 있다고 보고한 바 있다. 이러한 견지에서 Lambert등은 maltase, sucrase, amylase에 대한 저해 활성을 갖고 있는 세균 기원의 hydrolase inhibitor들은 성공적으로 당뇨 조절을 개선하였다는 보고를 한 바 있다. 본 연구에서 phytic acid의 현저한 혈당저하 효과는 phytic acid를 2.0% 함유한 식이를 급식한 쥐들에서만 관찰되어, phytic acid에 의한 혈당저하효과를 기대하기 위해서는 식이중 phytic acid의 함량이 적어도 2.0% 이상이 되어야만 가능할 것임을 시사한다.

95년 현재 한국인은 하루 1,100 g 정도의 식사를 하며, 이중 식물성식품으로 약 870g을 섭취하는 것으로 알려져 있다. 만약 식이 섭취량의 2%의 phytic acid를 섭취하기 위해서는 하루 20 g 이상의 phytic acid를 부가적으로 섭취되어야 하며, 이는 현실적으로 불가능한 섭취량이다.

Phytic acid 투여에도 불구하고 혈청의 Ca과 Mg의 함량은 크게 변동하지는 않는 것 같다. 그러나, total iron binding capacity (TIBC)는 phytic acid 투여군에서 높게 나타나고 있어, 철의 이용성에 phytic acid가 관여하고 있음을 시사한다. 즉, 혈청중 대부분의 철은 transferrin 또는 ferritin과 같은 단백질에 결합된 복합형으로 존재하며, 높은 TIBC 값은 혈청단백질과 결합하고 있는 철의 부족과 정의 관계를 갖고 있어, 식이성 phytic acid는 철의

이용도를 감소시킬 수 있음을 시사한다. 한국인의 철 섭취량은 권장량의 160%에 이르나 그중 75% 정도를 식물성식품으로 취하고 있어 (이용율 47% 내외) 충분한 양을 섭취하지는 못하는 것으로 추정된다.

결론적으로 쥐에게 식이성 phytic acid의 급여는 혈청지질농도에 대한 바람직한 효과보다 간장의 철의 함량감소와 혈청 TIBC에서의 증가를 유발시켰다. 혈당저하효과는 2.0% 이상의 phytic acid를 투여한 동물에서 관찰되었다. 이러한 결과들은 한국에서 재배된 쌀에 함유된 량과 대등한 phytic acid의 섭취는 철의 bioavailability를 감소시키는 것으로 판정된다.

4. 나이가 다른 동물에서 phytic acid의 투여효과

상승된 혈중 콜레스테롤 수치는 관상 심장 질환과 심장마비에 대한 주요 위험 요소들 중 하나로 간주되고 있으며, 나이가 증가할 수록 혈청콜레스테롤농도는 증가한다. 그러므로 정상적인 범위로 혈청 콜레스테롤의 농도를 유지하는 것은 순환기질환을 예방하기 위해 매우 중요하다 하겠다. 이러한 목적에서 약물치료 뿐만 아니라 식이의 섭생(攝生)은 폭넓게 보고되어지고 있다.

많은 연구로부터 체내콜레스테롤 조절 기전은 나이에 따라 변화하고 있음이 시사되어 왔다. 이러한 관점에서 식이조성에 대한 콜레스테롤 대사와 대사를 반영하는 조직지방질의 농도의 응답은 나이에 따라 변화되어질 것이다. 그러므로 phytic acid 투여효과가 나이에 따라 변화할 수 있는지를 검토하는 것은 매우 의미 있는 것으로 생각된다.

본 연구에서 1개월령의 young group의 쥐에서 phytic acid의 투여는 혈청콜레스테롤 저하 능력을 보여준 반면, 이러한 효과는 adult 흰쥐 (10개월)에서는 관찰할 수 없었다. 이런 결과로 식이 phytic acid의 식이효과는 나이의존성이라는 것을 시사하고 있다. 즉, 성숙한 경우 phytic acid에 의한 혈청 cholesterol 저하효과는 유의하지 않음을 보여준다.

쥐의 소장내 존재하는 phytase는 phytic acid에 대한 가수분해능력이 크지 않은 것으로 보이며, 그 분해능력은 나이에 따라 감소하는 것으로 알려져 있다. 또한, 혈청 콜레스테롤 농도는 식이성 myo-inositol에 의해 영향을 받지 않는다는 것이 보고되어 있다.

Phytic acid가 철 이온을 킬레이트하여 *in vitro* 항산화 활성을 발휘할 수 있을 것으로 알려져 있다. 그러나 본 *in vivo* 실험에서 식이 phytic acid 는 혈청과 간장의 TBA반응물질의 농도에 영향을 주지 않았다. 식이 phytic acid 가 동물과 사람에게서 철의 흡수를 감소시킨다는 것은 이미 알려져 있다. 그러나 이번 연구에서 보여주듯이 phytic acid 에 기인하여 혈청과 간장의 철이온농도는 크게 현저한 변화는 관찰되지 않았다. 곡류, 콩과식물과 땅콩 등에서 철의 대부분은 phytic acid에 의해 복합체로 되며, 이러한 킬레이트화는 유리철 이온을 감소시켜 종자의 지질과산화물을 억제할 것이다. 그러나, phytic acid 섭취시 소화관내에서 철이온에 의해 부분적으로 일어날 수 있는 지질과산화물의 억제가능성은 제시되어 있다.

한편, 간장의 미네랄 농도에 있어 특히 young 군의 Ca 이온농도의 감소가 관찰되고 있다. 본 실험에서는 비정제사료를 사용하였으므로, 비정제사료시 phytic acid 투여는 어린시기에 Ca 에 대한 요구량을 증가시킬 가능성이 있다. 혈청내 alkaline phosphatase 활성의 증가는 부분적으로 뼈조직의 파골화의 상승을 의미하는데, 본 연구에서 Alkaline phosphatase 의 활성에 phytic acid 투여에 의한 차이는 없었다. 이는 적어도 phytic acid 투여에 의해 유동성 Ca 량이 감소되었다는 것을 의미하며, 뼈의 파골화를 유도하지는 않은 것으로 사료된다. 간장중 Fe는 나이가 들어감에 따라, 나이에 따라 현저하게 상승하고 있음을 시사한다.

결론적으로, 흰쥐에서 식이성 phytic acid 에 응답하는 체내 콜레스테롤 pool 의 조절은 나이의존적임을 보이고 있으며, 그 응답은 나이에 따라 감소하고 있음을 알 수 있었다. 더불어, 실험동물의 혈청과 간장의 실험결과로부터 phytic acid 투여에 의한 *in vivo* 항산화효과는 없는 반면, young group에서 간장조직중 Ca의 감소를 가져오는 것으로 보여 phytic acid 섭취는 mineral 이용도에 부정적 요인으로 작용함을 확인할 수 있었다.

5. 장기간 phytic acid 섭취시 대사계의 응답

장기적인 phytic acid 의 섭취가 당질이나 단백질의 소화기능을 저해한다면, 궁극적으로는 신체의 성장, 체중증가에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 그러나 5개월간 한국인이 섭취하는 수준으로 phytic acid를 흰쥐에 투여하였을 때, 체중감소의 효과는 없었다. Phytic acid

투여에 의한 극적인 변화는 phytic acid 투여에 의한 혈청콜레스테롤농도의 상승이다. 지금까지 1개월 phytic acid 투여시 부분적인 혈청콜레스테롤농도의 감소와 간장콜레스테롤농도가 증가하였다. Phytic acid는 식사가 시작되면 일생동안 섭취하게 되므로 인간에게 있어서 장기간 phytic acid 를 섭취시 단기간 관찰되는 효과와는 다른 효과가 발휘되고 있다는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 phytic acid 섭취에 의해 오히려 혈청콜레스테롤농도의 상승이 유지되어, 생체내의 유익한 인자로 간주하기 어렵다. 또한 장기 투여시 간장이나 혈청의 과산화정도에 차이가 없어 항산화효과는 기대할 수 없었다. 반면 혈청중 Ca 과 철이온은 phytic acid 투여에 의해 감소하는 경향을 보이고 있다.

종합적으로 한국인의 주식인 쌀에서 phytic acid를 90 % 정도 감소시키게 되면, Ca으로 약 110mg 의 부가적인 섭취효과를 나타낼 수 있으며, 이는 우유 100 ml 에 들어 있는 량이다. 현재 한국인의 단백질섭취는 국민 권장량을 초과하고 있으며, 필요한 Ca을 우유를 통해 얻지 않고, 곡물자체로 획득할 수 있다면, 단백질섭취의 감소와 Ca 섭취증대라는 두가지의 효과를 동시에 기대할 수 있을 것으로 기대한다. 지금까지 phytic acid의 positive한 효과가 알려져 왔지만 본 연구에서 확인하지 못하였으며, phytic acid를 장기간 투여시 오히려 혈청콜레스테롤농도를 상승시키는 결과를 확인함으로써, phytic acid는 현재의 한국인에게는 antinutrient로서 작용할 수 있음을 보여준다.

제 5 절 참 고 문 헌

1. Maga, J.A. (1982) Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.* 30, 1
2. Reddy, N.R., Sathe, S.K. and Salunhke, D.K. (1982) Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28: 1
3. Harland, B.F. and Morris, E.R. (1995) Phytate : A good or a bad food component. *Nutr. Res.* 15: 733
4. Zhou, J.R. and Erdman, J.W.Jr (1995) Phytic Acid in Health and Disease. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 495
5. Thompson, L.U. (1988) Antinutrients and blood glucose. *Food Technol.* 42, 123
6. Choi, Y.S., Lee, H.W., Kim, N.S. Rhee, H.I. and Lee, S.Y. (1996) Variations of phytic acid and mineral nutrients in brown rice of Korean cultivars. p. 156. Abstract presented at 1996 annual meeting of American Society of Agronomy, Indianapolis.
7. Kim, H.S. Yoon, J.Y. and Lee, S.R.(1994) Effect of cooking and processing on the phytate content and protein digestibility of soybean. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26, 603
8. Tuntawiroon, M., Sritonku, N., Rossanderr-Hulten, L., Pleehachinda, R., Suwanik R., Brune, M. and Hallberg, L. (1990) Rice and iron absorption in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 44, 489
9. Klevay, L. M. (1977) Hypocholesterolemia due to sodium phytate. *Nutr. Rep. Inter.* 15: 587
10. Jariwalla, R.J., Sabin, R., Lawson, S. and Herman, Z.S. (1990) Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. *J. Appl. Nutr.* 42, 18
11. American Institute of Nutrition (1977) Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.* 107, 1340
12. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanly, G.H. (1957) A simple Method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497

13. Sperry, W.M. and Webb. M. (1950) A revision of the Schoenheimer–Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.* 187: 97
14. Fletcher, M. J. (1968) A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chim. Acta.* 22: 393
15. Rouser, G., Siakatos, A.N. and Fleischer, S. (1968) Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Lipids* 1, 85
16. Choi, Y.S., Lee, Y.I. and Lee, S.Y. (1996) Effects of extracts of *Coptis japonica* on lipid metabolism in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 27, 246
17. Van der Meer, R., De Bries, H., Glatz, J.F.C. (1985) t-Butanol extraction of feces, p. 113. In: *Cholesterol metabolism in health and diseases*, Beynen, A.C., Geelen, M.J.H., Katan, M.B. and Schouten, J.A. (ed.). Ponsen & Looijen, Wageningen
18. Katayama, T. (1995) Effect of dietary sodium phytate on the hepatic and serum levels of lipids and on the hepatic activities of NADPH-generating enzymes in rats fed on sucrose. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1159
19. Lambert, A.E., Damoiseaux, P., Buychaert, M., Hillebrand, L. and Ketelslegger, J.M. (1982) Improved glycemic control in type I diabetes, p. 417. In: *First International Symposium on Acarbose*, Creutzfeldt, W. (ed.). Excerpta Medica, Oxford
20. Choi, Y.S., Ide, T. and Sugano, M. (1987) Age-related changes in the regulation of cholesterol metabolism in rats. *Exp. Gerontol.* 22, 339
21. Lee, S.Y. and Choi, Y.S. (1990) Metabolic fate of cholesterol, p. 144. In: *Cholesterol (Korean)*, Lee, S.Y. and Choi, Y.S. (ed.). Shin Kwang Publishing Co., Seoul
22. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Sciences.* 232: 34
23. Marinetti, G.V. (1990) Dietary management of elevated blood lipids. p. 135. In: *Disorders of lipid metabolism*, Marinetti, G.V. (ed.). Plenum Press, New York
24. Morris, E.R. (1987) Iron, Vol. 1, p.79. In: *Trace elements in human and animal nutrition*, Mertz, W. (ed.). Academic Press, San Diego
25. Linder, M.C. (1991) Nutrition and metabolism of the Trace Elements. p. 215. In: *Nutritional biochemistry and metabolism*. Linder, M.C. (ed.). Elsevier, New York

26. Lewis, M. and Iammarino, R.M.(1971) Lipemia in rodent iron deficiency. *J. Lab. Clin. Med.* 78, 547
27. The Korean Nutrition Society (1989) The prevalence of the malnutrition symptom. p.53. In: Korean nutrition resources data. Shin Kwang Publishing Co., Seoul
28. National Cholesterol Education Program (1988) Report of the expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. NIH Publication, No. 88-2925, pp. 29-43
29. Kritchevsky, D. (1980) Age-related changes in lipid metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 165, 193
30. Yamamoto, M., and Yamamura, Y. (1971) Changes of cholesterol metabolism in ageing rat. *Atherosclerosis*, 13, 365
31. Choi, Y.S., Imasato, Y., IKeda, I., and Sugano, M. (1989) Effects of dietary carbohydrates on cholesterol metabolism in rats of different ages. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1343
32. Choi, Y.S., IKeda, I., and Sugano, M.(1989) Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on cholesterol synthesis and degradation in rats of different ages. *Lipids*, 24, 45
33. Choi, Y.S., and Sugano, M. (1988) Effects of dietary alpha- and gamma-linolenic acid on lipid metabolism in young and adult rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 32, 169
34. Kikugawa, K., Kojima, T., Yamaki, S., and Kosugi, H. (1992) Interpretation of the TBA reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and EDTA. *Anal. Biochem.*, 202, 249
35. Yagi K. (1982) Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In "Lipid Peroxides in Biology and Medicine", ed. Yagi, K., Academic Press, New York, pp. 223-242
36. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.R., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265
37. Hu, H.I., Wise, A., and Henderson, C. (1996) Hydrolysis of phytate and inositol tri-, tetra-, and penta-phosphates by the intestinal mucosa of the pig. *Nutr. Res.*, 16,

38. Williams, P.J., and Taylor, T.G. (1985) A comparative study of phytate hydrolysis in the gastrointestinal tract of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the laboratory rat. *Brit. J. Nutr.*, 54, 429
39. Nelson, T.S., and Kirby, L.K. (1979) Effect of age and diet composition on the hydrolysis of phytate phosphorus by rats. *Nutr. Rep. Int.*, 20, 729
40. Katayama, T. (1994) Effect of dietary addition of myo-inositol on lipid metabolism in rats fed sucrose or corn starch. *Nutr. Res.*, 14, 699
41. Yoon, J.H., Thompson, L.U., and Jenkins, D.J.A. (1983) The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 38, 835
42. Graf, E., Empson, K.L., and Eaton, J.W. (1987) Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.*, 262, 11647
43. Saha, P.R., Weaver, C.M. and Mason, A.C. (1994) Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2531
44. Lynch, S.R., Dassenko, S.A., Cook, J.D., Juillerat, M.A., and Hurrell, R.F. (1994) Inhibitory effect of a soybean protein-related moiety on iron absorption in humans. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 60, 567-572
45. Nahapetian, A., and Young, V.R. (1984) Metabolism of ¹⁴C-phytate in rats: effect of low and high dietary calcium intakes. *J. Nutr.*, 110, 1458.
46. Phillippy, B.Q., and Graf, E. (1997) Antioxidant functions of inositol 1,2,3-tri-phosphate and inositol 1,2,3,6-tetrakisphosphate. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 939
47. Terao, J., Ingemansson, T., Ioku, K., Yuki, H., and Ito Y. (1995) Effects of rat bile-pancreatic juice on Fe²⁺ induced peroxidation of phospholipids. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 55

제 3 장 Low Phytate Rice의 탐색 및 응용

제 1 절 서 설

최근에 돌연변이 처리나 유전자 조작을 통한 유용한 생물체의 선발 및 육종이 많은 연구자에 의해 진행이 되고 있다. 이때 목적으로 하는 생물체 선발의 성공 여부는 신속하고 정확한 스크리닝 방법의 확보 여부에 달려 있다고도 할 수 있다. 일반적으로 스크리닝에 있어 검사체의 수는 통상적인 분석 방법으로는 감당 할 수 없을 만큼 방대한 수이기 때문에 신속한 스크리닝 방법의 확보는 연구의 성패를 가름한다고 할만큼 중요하다고 할 수 있다.

특히 본 연구와 같이 시료의 수가 많은 돌연변이 유발체인 경우에는 신속한 스크리닝 방법의 중요성이 더욱 크다고 할 수 있다. 본 연구자 그룹에서 시도하여온 벼의 수정란 돌연변이 처리의 경우 통상적으로 10,000 계통 전후의 M₂ seed가 발생된다. 따라서 계통당 5개체의 종자를 분석한다고 하여도 한 실험군에서 50,000점 이상의 시료를 분석해야한다. 특히 식물체의 경우에는 다음해 과종기까지 모든 검체의 분석을 완료해야 할만큼 신속한 분석이 절실히 요구된다. 또한 일반적인 식품 분석에서와 같이 10g 전후의 시료를 확보하고 분석을 진행하는 것은 스크리닝 단계에서는 절대 불가능한 과정으로 남아 있다. 따라서 성분 육종의 경우 10mg 전후의 시료로 분석이 가능한 미량 분석 체계와 더불어 앞에서 언급한 신속 분석 체계의 확립이 전제되어야만 스크리닝이 가능하다고 할 수 있다.

현재 피틴산의 분석은 HPLC를 이용한 정량 방법, 피틴산을 발색시켜 정량하는 비색법, 중이 전기영동을 이용한 방법 등이 있다. 기존에 사용되는 방법을 살펴보면 우선 HPLC 방법은 추출한 시료를 anion exchange column을 이용하여 분리하게 되는데 RI detector는 감도가 낮아 생체시료를 그대로는 검출할 수 없으며 UV를 이용한 검출 방법은 피틴산이 특이한 흡광대를 가지고 있지 않기 때문에 검출이 불가능하다. 따라서 anion exchange column

상에서 분리 후 post column에서 철염과 반응하여 착색화합물을 만든 후 600 nm에서 검출하는 방법이 이용된다. 이때 피틴산의 용출은 질산과 같은 강산에 의해 가능하므로 HPLC system 자체가 내산성을 갖는 chromatography 체계를 갖추어야 하며 특수한 post column을 따로 장착하여야 하는 번거로움이 있다. 한 개의 시료 분석에 소요되는 시간은 약 60분 정도로 auto sampler를 채용하여 HPLC를 하루 종일 운전하여도 24개의 시료밖에 분석할 수 없어 소량의 시료 분석에만 유효한 방법이다. 비색법에 의한 분석은 우선 시료의 전처리가 뒤따라야 한다. 즉 추출한 피틴산을 철염과 반응하고 남은 철염의 색도를 측정하는 방법으로 하루 8시간을 일할 경우 300점 내외를 처리할 수 있다. 그러나 시료의 pH 및 기타 추출물의 영향을 크게 받으므로 정확도가 떨어지며 시료의 전처리에 많은 시간이 소요되므로 실제로 분석할 수 있는 시료의 양은 훨씬 줄어들게 되는 단점이 있다. 고전압 종이 전기영동 법은 피틴산의 분석에 있어 오래 전부터 이용되어온 방법으로 추출한 시료로부터 피틴산과 무기 인산을 동시에 검출할 수 있는 좋은 방법이나 한 번의 전기영동으로 약 30개 시료의 분석이 가능하나 1회 전기영동에 소요되는 시간이 약 3시간 전후로 하루 100개 정도로 이 역시 시료의 대량처리에는 한계가 있다. 이와 같이 기존의 분석방법들은 그대로 스크리닝 방법으로 이용하기에는 너무 복잡하고 긴 시간을 필요로 하며 이를 극복하기 위하여는 고가의 장비들을 대량 확보해야 하는 비경제성이 내재되어 있으므로 적절하지 못하다고 할 수 있다.

따라서 50,000점 내외의 시료를 단시간에 처리하기 위하여는 보다 더 신속하고 정확한 처리 방법의 개발이 필요하다고 할 수 있으며 새로운 방법은 비 이외의 다른 작물의 스크리닝에도 적용할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 신속한 스크리닝 방법의 확립을 목적으로 새로운 방법을 개발하여 돌연변이체의 선발을 성공적으로 마칠 수가 있었다. 즉, 고가의 장비가 필요치 않고 매우 간편하고 단순한 방법으로 신속한 스크리닝을 할 수 있는 새로운 방법이라고 할 수 있다. 그 결과 획득한 돌연변이체는 다른 세부 과제와의 공동연구를 통하여 돌연변이체의 대량 증식으로 성공리에 이어지고 있다. 또한 본 연구를 통해 획득한 돌연변이체의 일부 식품학적 특성을 검정하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 실험재료

가. 시료

1995년 일품벼의 수정란에 돌연변이 유기제인 N-methylnitrosourea(MNU)를 시간대별로 처리하여 파종하여 얻은 약 10,000계통의 돌연변이체(M₂ seeds)를 시료로 이용하였다. 선발된 종자는 매년 다음해 봄에 파종하여 가을에 수확하였으며 이를 low phytate rice(LPR) 선발 시료와 성분 분석시료로 이용하였다.

2. 실험방법

가. 인의 정량

1) Ammonium molybdate 法

총인산 및 무기인산, 피틴산에 함유된 인산의 정량은 ammonium molybdate를 이용한 비색법을 사용하였다. 희석된 표준용액과 각각의 방법에서 얻은 시료를 각각 200 μ l씩 시험관에 넣은 후 ddH₂O 2mL을 가하고 발색시약(ddH₂O : 6N H₂SO₄ : 2.5% Ammonium molybdate : 10% L-ascorbic acid = 2 : 1 : 1 : 1) 2mL을 잘 혼합하였다. 인산표준용액을 인산으로서의 농도가 200 μ l당 0, 40, 80, 120, 160, 200 μ g이 되도록 희석하였다. 상온에서 10분 동안 방치시킨 후 흡광도를 600nm에서 측정하여 검량곡선을 작성하고 그로부터 각각의 시료에 함유된 인의 양을 측정하였다.

2) 피턴테 인의 정량

원심분리관에 시료(쌀 분말) 1.0g과 10% Na_2SO_4 를 함유한 1.2% HCl 10mL을 넣고 12시간 동안 4℃ 냉장고에서 stirring한 후 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 10mL의 상등액을 30mL의 원심분리관에 넣고 ddH₂O 10mL, 철 용액(0.6% HCl , 5% Na_2SO_4 , 15mM FeCl_3) 5mL을 가하여 water bath에서 30분간 끓인 후 8,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이 침전물에 0.6% HCl 10mL을 넣고 현탁한 후 8,500rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 세척하였으며 이 과정을 2회 반복하였다. 얻어진 침전물은 원심분리관을 거꾸로 하여 건조하였다. 건조된 시료는 정확하게 무게를 측정하고 측정된 양 중에서 0.15g을 가수분해튜브에 넣고 conc. H_2SO_4 2mL을 가하였으며 12시간 동안 방치한 후 tube를 가수분해 장치에 올려 놓고 pasteur pipette을 이용하여 3 mL정도의 H_2O_2 로 가수분해관 튜브에 묻은 잔여물을 씻어 내렸다. 시료를 넣지 않은 것을 만들어서 시료가 들어있는 것과 같이 진행하였으며 이를 blank로 이용하였다. 가수분해 튜브를 220℃ - 240℃에서 20 - 25분간 열을 가하고 약 15분 동안 식혔다. 가수분해 튜브가 어느 정도 식으면 H_2O_2 를 가한 뒤 위와 같은 조작을 시료가 투명해 질 때까지 반복하였다. 시료가 투명해지면 ddH₂O를 12.5mL로 fill up 하여 ammonium molybdate 방법으로 인을 측정하였다.

3) 총인산의 정량

시료 0.1g을 가수분해 튜브에 넣고 conc. H_2SO_4 2mL을 가하였으며 시료를 넣지 않은 것을 blank로 만들어서 시료가 들어있는 가수분해 튜브와 같이 진행하였다. 가수분해 튜브를 12시간 동안 방치한 후 가수분해 장치에 올려놓고 pasteur pipette을 이용하여 3 mL정도의 H_2O_2 를 이용하여 벽면의 잔여물을 씻어 내렸다. 가수분해 장치를 220℃ - 240℃로 20 - 25분간 열을 가하고 약 15분 동안 식혔다. 가수분해 튜브가 어느 정도 식으면 H_2O_2 를 가한 뒤 위와 같은 조작을 시료가 투명해 질 때까지 반복하였다. 시료가 투명해지면 ddH₂O를 12.5mL로 fill up 하여 ammonium molybdate 방법으로 인을 측정하였다.

4) 무기인산의 정량

Freezer에 보관되어 있던 mortar에 냉각한(4℃-0℃유지) 0.02M MgCl₂를 함유한 12.5% TCA 용액 4mL과 시료 0.15g을 넣고 잘 마쇄한 후 냉각한 원심분리관으로 옮겨 4℃에서 12,000rpm으로 15분간 원심분리한 후 상등액은 냉각한 원심분리관으로 옮겨졌다. 또한 침전물에는 TCA 용액을 약간 넣어 다시 원심분리하여 상등액을 모았으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 원심분리관으로 옮겨진 상등액을 TCA 용액을 이용하여 12.5mL로 fill up 하여 ammonium molybdate 방법으로 인을 정량하였다.

나. 피틴산 정량

1) 피틴산의 추출

원심분리관에 쌀 분말 1.0g과 0.01N HCl 10mL을 넣고 12시간동안 4℃ 냉장고에서 stirring 한 후 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 피틴산 정량의 시료로 이용하였다.

2) Wade reagent를 이용한 정량

희석된 피틴산 표준용액과 시료를 각각 3mL씩 준비하고 1mL의 Wade reagent (0.03% FeCl₃ · 6H₂O in 0.3% sulfosalicylic acid)를 넣은 후 잘 혼합하였다. 검량곡선은 피틴산 농도가 0, 20, 40, 60, 80, 100µg 피틴산/mL 0.01N HCl이 되도록 표준용액을 희석하였으며 blank는 ddH₂O로 하였다. 상온에서 7분간 방치한 후 표준용액과 시료의 흡광도를 500nm에서 측정하였다. 검량곡선을 이용하여 시료의 피틴산을 정량하였다.

3) 고전압 종이 전기영동(High voltage paper electrophoresis, HVPE)을 이용한 정량

분무기를 이용하여 0.1M oxalic acid-NaOH(pH 1.6) 완충용액을 1MM Whatman chromatography paper에 분무한 후 피틴산 추출액을 여과지에 loading했다. 여과지를 0.1M oxalic acid-NaOH(pH 1.6) 완충용액이 들어 있는 HVPE장치(ADVANTEC EF-406,

Advantec社, 일본)에 장치하고 약 80mA의 전류를 통해 전기영동을 하였다. 이때 전기영동 장치의 냉각용매는 4℃를 유지하였으며 전기영동이 끝난 후 여과지는 잘 풍건하였다. 풍건된 여과지는 ammonium molybdate, 증류수, perchloric acid, 진한 HCl과 acetone으로 이루어진 염색액으로 염색시킨 후 미리 가열해둔 85℃ oven에서 1-2분간 가열시킨 후 1-2일간 발색시켜 발색된 spot의 세기를 비교하였다.

다. IP₁ Kinase 활성 측정

5 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 50 mM HEPES(pH 7.0), ¹⁴C Inositol-1-phosphate(0.2 uCi)로 구성된 반응액에 효소액 75μl를 가하고 (총량 100μl) 30 C에서 20 분간 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid(TCA) 30μl를 가하여 반응을 정지시킨다. 반응 정지액을 10,000g에서 10 분간 원심분리한 후 상등액 200μl를 취하여 HPLC로 반응 생성물(IP₂)의 양을 정량하였다.

라. 반응 생성물의 분석

1) High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

Waters社의 HPLC 에 Hewlett Packard社의 liquid scintillation counter를 연결시켜 기질 및 생성물의 ¹⁴C의 신호를 검출하였으며 검출된 신호는 Flo-One/Beta A280 software를 이용하여 적산하였다. 분석에 사용한 column은 Whatman社의 strong anion exchange(SAX) column 을 주로 사용하였으며 필요에 따라서 weak anion exchange(WAX) column을 사용하였다. 용출 전개액은 물과 1 M ammonium phosphate (pH 3.8)을 gradient, 또는 적당한 농도의 ammonium phosphate를 isocratic으로 용출 하였으며 column 온도는 실온이었다.

2) Bio-Rad AG 1X8 column chromatography

Bio-Rad AG 1X8 resin(H⁺ form)을 column(1.5 mL)에 충전한 후 반응물을

chromatography 하였다. 용출액으로는 물과 1 M ammonium formate를 사용하여 실온에서 stepwise로 용출하였다. 용출된 fraction은 1 mL씩 분취하여 liquid scintillation counter로 ^{14}C 신호를 검출하여 정량하였다.

3) High Voltage Paper Electrophoresis(HVPE)

반응액 $20\mu\text{l}$ 를 Whatman No. 1 filter paper (30 X 57 cm)에 loading한 후 8°C 에서 80 mA 로 약 3 시간 전기영동을 하였다. 영동이 끝난 후 여과지를 잘 말린 후 ammonium molybdate-perchloric acid로 발색시켜 위치를 확인하고, 1.2cm 간격으로 잘라 liquid scintillation counter로 ^{14}C 의 신호를 정량하였다. 한편 생성물의 위치를 확인하기 위하여 autoradiogram도 병행하였다.

4) Thin Layer Chromatography (TLC)

반응액을 Polyethyleneimine Cellulose TLC plate에 spot한 후 1M ammonium formate로 전개하였다. 전개가 끝난 후 autoradiogram 과 ammonium molybdate - perchloric acid로 발색시켜 생성물의 위치를 확인하였다.

마. 지방산 분석

1) 지방산 추출

곱게 마쇄한 시료 100mg을 취하여 시험관에 넣은 후 1mL의 n-hexane을 가한 후 30분 간격으로 4회 vortexing하였다. 2시간 후 원심분리하여 상등액을 새로운 tube로 옮긴 후 다시 1mL의 n-hexane을 가하여 재 추출하였다. 추출액을 모두 모아 중성지방질 시료로 하였다. 중성지방질을 추출하고 난 뒤의 침전물은 chloroform : methanol (2:1)을 이용하여 같은 방법으로 극성지방질을 추출하였다.

2) Sterol의 제거

각각의 지질 추출물에 KOH용액(0.53M KOH in 94% ethanol) 400 μ l를 넣고 vortexing한 후 40 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 동안 열을 가하였다. 시료를 다시 vortexing한 후 400 μ l ddH₂O를 가하고 나서 hexane 300 μ l로 3회 추출을 반복하였다. 여기에 17.5% HCl 40 μ l를 넣고 잘 혼합한 후 다시 hexane 300 μ l로 3회 반복하여 추출한 후 tube에 모아 hexane층을 dry up 하였다.

3) Methylation

Sterol을 제거시킨 시료에 dichloromethane 100 μ l를 가하여 vortexing한 후 시료 100 μ l를 screw cap tube로 옮겼다. 무수 methanol-초산용액(무수 methanol 100mL + acetyl chloride 10mL) 200 μ l를 첨가시키고 끓는 수욕상에서 2시간동안 가열하였다. 500 μ l hexane으로 3회 추출하여 상등액을 모았다. 모은 상등액에 400 μ l의 2% KHCO₃용액을 넣어 씻어내고 상등액을 새로운 tube로 옮겨 gas chromatography의 시료로 이용하였다.

4) Gas chromatography의 조건

Gas chromatograph의 본체는 Hewlett Packard 5890 Series II를 이용하였고 6FT 10# SILAR-10C WHP 칼럼을 사용하였다. Carrier gas는 질소를 이용하였으며 가스 압력은 40psi를 유지하였다. Detector와 injector의 온도는 모두 250 $^{\circ}$ C를 유지하였으며 FID detector를 사용하였다. Oven 온도는 150 $^{\circ}$ C에서 200 $^{\circ}$ C로 분당 2 $^{\circ}$ C씩 증가시키는 gradient system을 이용하였다.

바. 전분의 이화학적 성질 조사

1) 전분의 추출

쌀을 곱게 마쇄한 후 30 mesh의 체를 이용하여 crude starch를 조제하였다. 0.2% NaOH 용

액으로 24시간 동안 세척하였으며 그 침전물은 다시 4시간 동안 0.2% NaOH 용액으로 세척하였다. 이 침전물은 약 4시간 동안 중성 pH가 될 때까지 약 3회 내지 4회에 걸쳐 세척하였다. 고운 체(200 mesh)를 이용하여 걸러서 전분을 얻어내었다. 이 전분은 95% ethanol 용액으로 3회 세척하여 탈지 시켰으며 65°C에서 약 3-4시간 건조시켰다. 이 시료는 다시 무수 ethanol 용액으로 탈수시켰으며 70°C에서 약 24시간동안 vaccum dry 하였다. 이것을 정색도와 blue value를 측정하기 위한 시료로 이용하였다.

2) 전분의 정색도 측정

전분 무수물 40mg에 2.5N NaOH 1mL을 넣어 상온에서 약 12시간 방치하였다. 여기에 ddH₂O 10mL을 넣어 희석하여 80°C에서 15분 동안 가열하였다. 이 액을 냉각시킨 후 ddH₂O를 이용하여 50mL로 fill up 하였다. 이 중에서 5mL을 취하여 다시 2배 희석 후에 2.5N HCl로 중화시켰다. Iodo용액(0.1% iodine, 0.1% potassium iodide) 2.5mL 가하였으며 다시 ddH₂O를 이용하여 50mL로 fill up하였다. 이 액을 흡광계(Hitach, 일본)를 이용하여 최대파장을 검색하였다.

3) 전분의 blue value 측정

전분 무수물 20mg에 ddH₂O 1mL을 첨가 후 90°C에서 45분간 호화 시켰다. 이 중에서 1mL을 취하여 1.0N NaOH 0.5mL을 첨가하고 비등수욕상에서 3분간 가온 후 실온에서 냉각하였다. 1N HCl로 중화시키고 potassium bitartrate 90mg을 첨가하고 ddH₂O를 이용하여 45mL이 되게 fill up 하였다. 요오드액(2mg I₂/mL, 20mg KI/mL) 0.5mL을 넣고 50mL로 ddH₂O를 이용하여 fill up 하였다. 이 액을 20분간 방치 후 625nm에서 흡광도를 측정하였다. Blue value치는 흡광도×4/전분용액의 농도(mg/100mL)의 식을 이용하여 산출하였다.

사. 단백질의 전기영동

전기영동장치(Bio-Rad, 미국)를 이용하여 Laemmli SDS-PAGE 방법으로 전기영동하였다.

전기영동이 끝난 후 겔 염색은 Coomassie blue를 이용하여 염색하였다

제 3 절 결 과

1. LPR의 선발

가. 검체중 피틴산의 분석

1) 비색법

비색법을 이용한 피틴산 정량법의 원리는 시료 중에 존재하는 피틴산을 과잉의 제2철 용액과 반응시켜 불용성 염으로 만들어 제거 한 후 용액 중에 남아 있는 제2철의 양을 측정하는 것이다. 이 방법은 실제로 측정하는 데 소요되는 시간이 비교적 짧은 간편한 방법의 하나이나 시료의 상태에 따라 적용할 수 없는 경우가 나타나곤 하였다. 시료가 콩이나 이유식과 같이 단백질 성분 또는 제2철과 반응하는 기타 성분이 존재하는 경우에는 반응액에 침전이 형성되어 정확한 측정을 할 수 없는 경우가 발생하곤 하는 실용상의 문제점을 내포하고 있다. 특히 단백질이 다량 함유되어 있는 경우에는 침전의 형성이 심각하여 단백질 함량이 많은 콩과 같은 경우에는 사용할 수 없는 것이 문제로 남아 있다. 또한 추출액의 pH에 크게 영향을 받아 발색도의 민감성을 찾아보기 힘든 것도 문제점의 하나이다. 따라서 이 방법을 정확하고 신속한 LPR 스크리닝 방법으로 적용하려면 pH에 대한 민감성을 해소하거나 조절하여야 하며 3가철과 불용성 염을 형성하는 방해물질을 제거하여야 하는 번거로움과 문제점이 있다. 본 방법을 LPR 스크리닝 방법으로 이용할 경우 하루 8시간에 시료 300점 정도밖에는 처리할 수 있을 것이나 기타 발색 방해 물질이 존재할 경우에는 실제 측정할 수 있는 범위는 훨씬 줄어들게 된다.

2) HVPE 방법

HVPE 전기영동 법은 피틴산의 분석에 있어 오래 전부터 이용되어온 방법으로 추출한 시료

로부터 피틴산과 무기 인산을 동시에 검출할 수 있는 좋은 방법이다. 그러나 전기영동 후 발색하는 과정은 정량적인 검출보다는 반정량적인 검출밖에는 되지 않는 문제점이 있다. 이를 극복하여 정량적으로 검출하기 위해서는 해당 부분의 spot를 오려내어 인을 정량하는 복잡한 과정을 거쳐야 하는 문제점이 있다. 또한 한 번의 전기영동으로 약 30개 시료의 분석이 가능하나 1회 전기영동에 소요되는 시간이 약 3시간 정도이므로 하루 분석할 수 있는 시료의 양은 100개 전후로 한정이 된다. 또한 전기영동 후 발색시킨 후 결과를 분석하기까지는 약 2일 정도가 소요되고 분석한 결과물의 장기 보존이 불가능한 결정적인 약점을 지니고 있어 이 방법 역시 시료의 대량처리에는 한계가 있다.

3) HPLC 방법

HPLC를 이용한 피틴산의 분석은 anion exchange column을 이용하여 피틴산을 분리하고 검출하는 과정을 거치게 된다. 피틴산의 분리시 사용되는 용매로는 인산염이나 산용액을 사용하여야 한다. 인산염의 농도를 높여 용출할 경우 검출할 수 있는 방법은 방사성 동위원소를 이용할 경우에 한하여 가능하다. 즉 방사성 동위원소로 표식된 피틴산 및 그 관련 화합물의 경우에만 검출이 가능하다. 이는 HPLC 방법에서 피틴산의 검출방법에 있어 RI detector는 감도가 낮아 생체시료를 그대로는 검출할 수 없으며 UV를 이용한 검출 방법은 피틴산이 특이한 흡광대를 가지고 있지 않기 때문에 검출이 불가능하기 때문이다. 피틴산의 발색에 의한 방법을 이용할 경우 인산염은 피틴산의 발색에 영향을 미치므로 이 경우 피틴산의 용출은 질산과 같은 강산에 의해 용출하여야만 한다. 이 경우 HPLC system 자체가 질산과 같은 강산에 내산성을 갖는 chromatograph 체계를 갖추어야 한다. 피틴산의 발색에 의한 검출법은 피틴산과 반응하고 남은 제2철의 양을 측정하는 방법으로 anion exchange column 상에서 분리한 후 post column에서 반응을 하여야 하는 과정을 거치게 되므로 장치의 복잡성을 더해줄 뿐 아니라 분석 기기마다 장치하여야 하는 실제적인 어려움이 뒤따르게 된다. 이러한 분석과정의 복잡성으로 이내 한 개의 시료 분석에 소요되는 시간은 약 60분 정도로 auto sampler를 채용하여 HPLC를 하루 종일 운전하여도 24개의 시료

밖에 분석할 수 없어 소량의 시료 분석에만 유효한 방법이다.

이상과 같이 살펴본 기존의 분석방법들은 너무 복잡하고 긴 시간을 필요로 하며 이를 극복하기 위하여는 고가의 장비들을 대량 확보해야 하는 비경제성이 내재되어 있으므로 소량의 시료를 분석하기에는 가능하나 그대로 스크리닝 방법으로 이용하기에는 적절하지 못하다고 할 수 있다.

나. 대량 스크리닝 방법의 확립

1) 피틴산 함량과 유리 무기 인산과의 상관관계

본 연구팀에 의해 선발된 영덕벼 LPR mutant에 있어서 피틴산의 양과 유리 무기 인산의 양은 부의 상관관계를 갖고 있음이 밝혀졌다. 즉 LPR mutant에 있어서 줄어든 피틴산 중의 인산 함량만큼의 인산이 유리 무기인산으로 존재하여 결과적으로 종자내의 총인산의 양은 parent와 변함이 없었다. 이는 피틴산 형태로 존재하여야 할 인산이 무기인산 형태로라도 조직 중에 존재하여야 하는 것을 의미한다. 따라서 mutant에 있어서나 parent에 있어서 존재하는 총인산의 양은 일정하여야 한다는 것을 의미하며 조직 중에 함유된 무기인산의 양이 증가한 만큼 피틴산의 양이 감소하였다는 근거가 될 것으로 기대할 수 있다.

피틴산의 양을 측정하기는 매우 복잡하고 많은 시간을 필요로 하지만 종자 내에 함유된 인의 정량은 복잡하지도, 많은 시간을 요구하지도 않으므로 간단하고 작은 scale로 종자내의 인을 정량하는 방법을 확립하여 LPR의 스크리닝에 도입하였다.

2) LPR 스크리닝 방법의 확립

가) 시료의 추출

종자를 반으로 잘라 씨눈 쪽은 보관하였으며 나머지 반쪽 시료는 분쇄하여 micro tube에 넣고 1.2%의 염산 0.5mL을 가한 뒤 하루 동안 냉장고에서 방치하며 3번에 걸쳐 vortexing 한 후 원심분리하여 상등액을 시료로 하였다.

나) 발색

추출액 10 μ l를 microtitrate plate에 넣고 ddH₂O 100 μ l와 발색시약(ddH₂O : 6N H₂SO₄ : 2.5% ammonium molybdate : 10% L-ascorbic acid = 2 : 1 : 1 : 1) 100 μ l를 가한 후 20분 간 상온에서 방치한 뒤 microplate reader(Bio Rad, 미국)를 이용하여 595nm에서 측정하여 발색이 많이 된 것을 선발하였다(Figure 1).

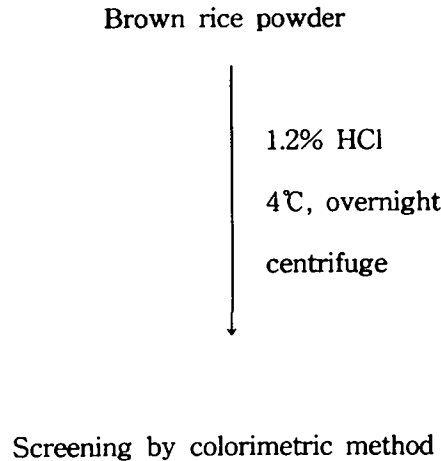


Figure 1. Screening procedure of low phytate rice

다) 확인

2의 방법으로 발색도가 높은 계통은 스크리닝한 후 HVPE를 이용하여 피틴산의 감소정도를 확인하였으며, HPLC를 이용하여 정량하여 피틴산이 감소된 것을 직접적으로 확인한 후 과

중하였다.

2. LPR의 스크리닝

가. M₂ seed의 스크리닝

1) M₂ seed의 선발

1995년에 돌연변이를 유기하여 얻은 일품벼 돌연변이 10,000여 계통에 대하여 2의 나에 확립된 방법으로 스크리닝하였다. 계통당 5개의 종자를 무작위적으로 채취하여 각각 껍질을 벗기고 종자를 반으로 잘라 씨눈 쪽은 보관하였으며 나머지 반쪽 시료는 분쇄하여 분석에 이용하였다. 선발 결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 90% 이상 감소경향을 보이는 것과 70% 이상, 50% 이상 감소경향을 보이는 것으로 각각 분류하였으며 90%이상 감소한 5계통, 70%이상 감소한 5계통과 50%이상 감소한 16계통을 스크리닝하였다.

Table 1. Phytate reduction rate of Ipum M₂ seeds

M ₁ plants No.	Rate of phytate reduction(%)		
	<50%	<70%	<90%
CM01 -20 -16	2	0	0
-39 -20	1	0	0
CM02 - none	0	0	0
CM03 - none	0	0	0
CM04 -06 -01	3	0	0
-16 -15	2	1	0
-22 -16	1	0	0

CM05 -12 -14	4	0	0
-24 -19	0	0	4
-26 -16	1	0	0
-33 -06	1	0	0
CM06 -29 -18	0	0	3
-37 -06	2	0	0
CM07 -06 -05	0	1	0
-23 -15	1	0	0
-29 -19	1	0	0
CM08 - none	0	0	0
CM09 - none	0	0	0
CM10 -08 -04	1	0	0
-15 -11	0	2	0
-41 -20	1	0	0
CM11 -23 -08	0	0	2
CM12 -03 -08	1	0	0
CM13 -02 -04	0	2	0
-08 -12	0	3	1
-24 -11	1	0	0
CM14 -16 -17	1	0	0
-37 -07	0	0	4

2) 비색법에 의한 M₂ seed의 피틴산 정량

LPR 검색에 이용된 방법은 정확하게 피틴산의 함유량을 측정할 수는 없다. 피틴산의 정량 방법은 HPLC를 이용한 방법과 비색법으로는 Haug와 Lantzsch의 방법, Latta와 Eskin의 방법 등이 있다. 본 실험에서는 Wade reagent를 이용하여 간단하게 정량할 수 있는 Latta와 Eskin의 방법과 HPLC 방법, HVPE 방법 등을 통하여 피틴산을 확인하였다.

3) LPR 확인을 위한 HVPE 분석조건의 확립

피틴산은 inositol의 기본 구조에 6개의 인산이 결합한 형태로 중간 산물은 인산이 하나 결합된 것부터 5개 결합된 것까지 다양하게 존재한다. 또한 HVPE는 피틴산을 반정량할 수

Table 2. Content of phytate in parent and LPR mutant(M₂ seed)

Strains	Phytate (mg/g brown rice powder)
Parent	11.82
LPR mutant	1.92

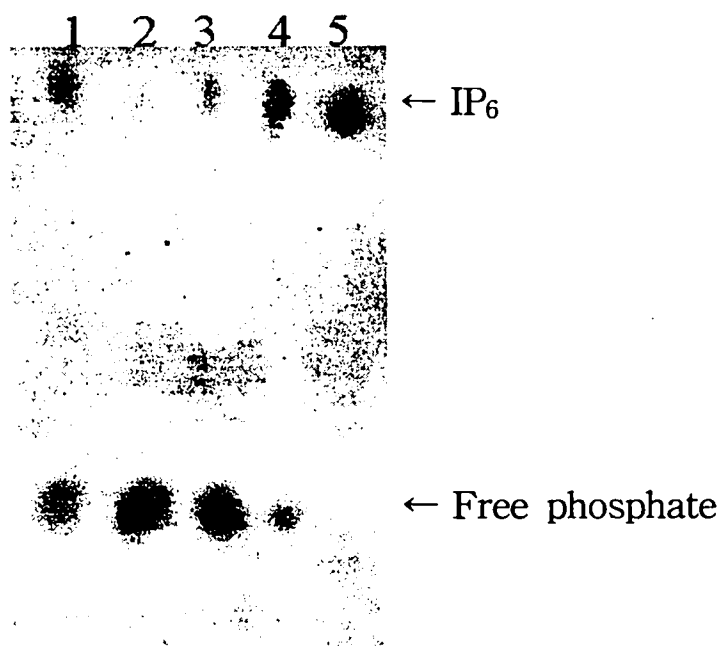


Figure 2. HVPE of phytate extracted from Ilpum parent and LPR mutants(M₂ seed)
 Lane 1, 2, 3: LPR mutants, 4: Ilpum parent, 5: Phytate 20µg

있는 방법으로도 이용될 수 있다. 그러므로 이들 중간체들이 잘 분리되기 위한 조건을 확립하는 것은 중요하고 할 수 있다. 전기영동의 분리능은 영동 buffer와 영동시의 전류 등에 의해 좌우된다. 특히 전기영동 buffer의 pH는 하전을 띤 inositol phosphate들을 분리하는데 상당한 영향을 미치므로 다양하게 전기영동 buffer의 종류와 전류를 바꾸어 전기영동 조건을 검토하였다. 최적 전기영동조건과 염색조건을 정리하면 다음과 같다.

분무기를 이용하여 0.1M oxalic acid-NaOH(pH 1.6) 완충용액을 1MM Whatman chromatography paper에 분무한 후 쌀 시료로부터 추출한 피틴산 추출액을 여과지에 loading했다. 여과지를 완충용액이 들어 있는 전기영동조에 setting하고 난 뒤 cool-X를 여과지가 잠기도록 채우고 약 80mA의 전류를 마커로 이용된 picric acid가 원하는 위치까지 전개될 때 통전을 멈추었다. 여과지는 잘 풍건하였다. 풍건된 여과지는 ammonium molybdate, 증류수, perchloric acid, 진한 HCl과 acetone으로 이루어진 염색액으로 염색시킨 후 미리 가열해둔 85°C oven에서 1-2분간 가열시켰다. 이렇게 까지 처리된 여과지는 brown wrapping paper에 끼워 넣은 채로 1-2일간 발색시킨 후 결과를 확인하였다(Figure 2).

확립된 HVPE 조건으로 쌀에 함유되어 있는 피틴산 중간체와 피틴산을 확인할 수 있는 것은 타 식물 시료에도 적용시킬 수 있을 것으로 판단되어 콩과 옥수수 등과 같은 작물을 대상으로 적용시켰다. 옥수수와 콩을 쌀의 경우와 같은 조건으로 추출하여 HVPE로 분석한 결과(data not shown) 옥수수의 경우에는 쌀과 같이 깨끗한 전기영동상을 보여주고 있으나 콩의 경우 무기인산부근에 발색되는 미지물질이 많이 존재하고 있어 쌀의 경우와는 다른 양상을 보여주고 있다. 이는 콩 속에 다량으로 존재하는 단백질의 영향에 의한 것으로 판단이 되며 콩의 경우에는 분석 전 단계에서 미지물질의 제거가 이루어져야 함을 나타내 주고 있다.

4) HPLC를 이용한 LPR의 확인

LPR의 1차 스크리닝에서 획득한 돌연변이체 종실 중에 존재하는 피틴산의 양을 HPLC를 이용하여 정량하여 피틴산의 양을 비교하였다. 분석조건은 Waters 712 WISP기종에

strong anion exchange(SAX) column을 이용하여 분리하였으며 피틴산의 용출은 0.1 N HNO₃로 1 mL/min 의 유속으로 진행하였다. 용출 후 검출은 post column상에서 제2철과 반응시켜 발생된 색소의 양을 550 nm에서 흡광도의 변화로서 측정하였다. LPR mutant와 parent를 각각 분석하였으며 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. 피틴산 영역 peak의 면적 으로부터 계산한 피틴산의 양은 parent에 비하여 mutant의 양은 약 92% 감소하였다. 또한 이 값은 피틴산의 함량을 비색법으로 측정한 결과(Table 2)와도 일치하고 있으며 Figure 2의 HVPE 결과와도 잘 일치하고 있다.

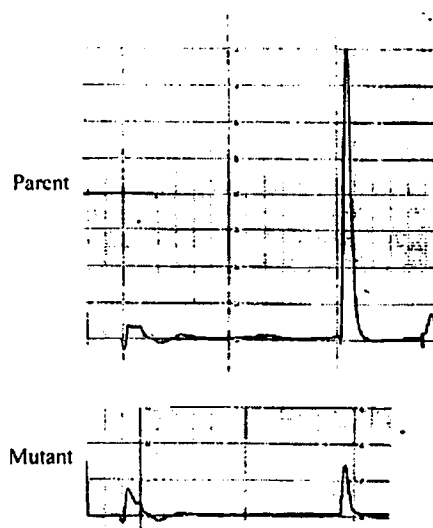


Figure 3. HPLC chromatogram of phytate extracted from lupum parent and LPR mutants(M₂ seed)

나. M₂ mutant 의 증식

LPR mutant로 선발된 5계통의 종자는 M₃계통으로 확보하기 위하여 모두 파종하였다.

1) M₃ seed mutant의 스크리닝

1996년도에 수확한 일품 M₃ seeds 35계통의 피틴산 함량 분포를 파악하기 위하여 시료를 random하게 10알씩을 취하여 씨눈쪽 반알은 보관하고 반쪽만으로 스크리닝하였다. 즉 350개의 반쪽 종실을 스크리닝한 결과 피틴산이 90%이상 감소한 종실이 250여 개로 약 70%가 90% 이상 감소한 것으로 나타났다. 이로 인해 LPR의 고정화가 순조롭게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다. 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 분석시료로 이용하고 남은 씨눈을 포함한 나머지 반쪽은 M₄ seed 육종을 위해 모두 육종되었다.

Table 3. Phytate reduction rate of Ilpum M₃ seeds

M ₂ plants no.	Rate of phytate reduction(%)		
	<50%	<70%	<90%
CM05-24-19-14	0	0	10
CM06-29-18-06	0	0	10
-19	0	1	9
-28	0	0	10
-32	0	0	10
-33	0	1	9
CM11-23-08-01	0	0	10
-05	0	6	4
-07	0	2	8
-10	1	2	7
-13	0	0	10
-17	0	3	7
-21	0	6	4
-25	0	0	10
-32	0	0	10
-34	0	0	10
-36	0	7	3

-42	0	1	9
-44	0	9	1
-53	0	0	10
-63	0	3	7
-64	0	1	9
-69	1	9	0
-76	0	7	3
CM13-08-12-06	10	0	0
-12	0	7	3
-14	10	0	0
-17	3	7	0
-26	3	6	1
-35	3	6	1
-60	10	0	0
CM14-37-07-17	0	0	10
-18	0	0	10
-19	0	0	10
-20	0	0	10

Table 4. Content of phytate in parent and LPR mutant(M₃ seed)

Strains	Phytate (mg/g brown rice powder)
Parent	11.10
CM06-29-18-33	1.14
CM11-23-08-36	1.34
CM14-37-07-19	3.36

2) HVPE를 이용한 LPR의 확인

M₃ seed 중 피틴산 함량이 낮은 mutants와 일품 parent 몇 개를 골라 확립된 HVPE 전기

영동 방법을 이용하여 분석하였다. 추출 조건도 모두 같게 하였으며 loading 되는 양도 같게 하였다. LPR screening 결과와 마찬가지로 피틴산의 함량이 낮게 나타난 종자에 대해서는 이 결과에서도 피틴산의 band가 나타나질 않고 있다. 또한 피틴산 중간체가 보이질 않고 있다. 이것은 inositol phosphate의 생합성 경로를 어느 정도 추측할 수 있는 결과로서 종자가 완전하게 성숙하기 전에 피틴산 중간체들은 완전히 피틴산으로 전환되는 것으로 추측된다. (Figure 4)

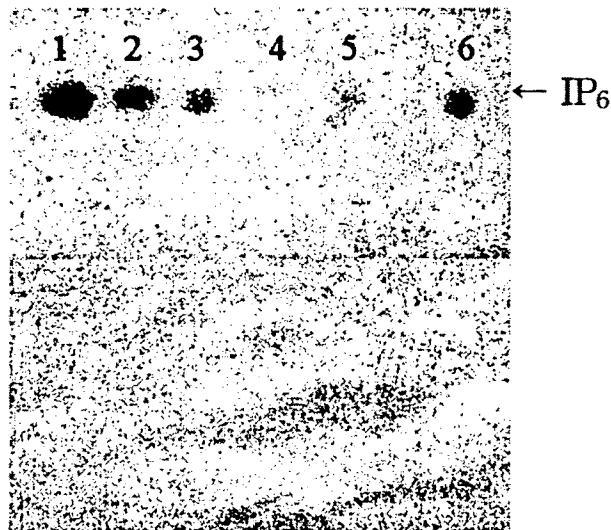


Figure 4. HVPE of phytate extracted from Ilpum parent and LPR mutants(M₃ seed)
Lane 1 : Phytate 40 μ g, 2 : Phytate 20 μ g, 3 : Phytate 10 μ g,
4 : CM06-29-18-33, 5 : CM14-37-07-19, 6 : Ilpum parent

다. M₃ mutant의 증식

1) M₄ seed mutant의 스크리닝

1997년에 일품벼 M₃ 종자 35계통을 파종하여 M₃ 식물체 288계통을 얻었으며 이에 대한 M₄ 종자의 LPR 검색 결과는 Table 5와 같다. M₃ 종자로부터 자가 증식된 M₄ 종자의 피틴산 함량을 분석하여 보면 M₂ 식물체 계통 특징적으로 피틴산의 함량이 분포함을 알 수 있다. 즉, M₄ 종자의 피틴산함량을 분석한 결과에 의해 M₂ 식물체도 90% 이상 감소된 것과 70%, 50% 그리고 감소되지 않은 것으로 분류할 수 있었다. 일례로 CM13-08-12-14 계통은 피틴산 함량이 감소되지 않은 계통으로 보여지고 CM13-08-12-17의 계통은 대부분이 70%이상 감소한 경향을 보이고 있다. 또한 CM11-23-08-10의 계통은 90%이상 감소된 것으로 분석되었다. 결과적으로 세대를 증식시킴에 따라 LPR은 유전적으로 고정되는 것으로 보여진다.

Table 5. Phytate reduction rate of Ilpum M₄ seeds

M ₃ plants No.	Rate of phytate reduction(%)		
	<50%	<70%	<90%
CM05-24-19-14-01	5	0	0
" -02	4	1	0
" -03	0	0	5
" -04	5	0	0
" -05	1	3	1
" -06	5	0	0
CM06-29-18-06-01	0	0	5
" -02	0	0	5
" -03	0	0	5
" -04	0	0	5
" -05	0	0	5
" -06	0	1	4
" -07	0	0	5
" -08	0	0	5
" -09	0	0	5

CM06-29-18-19-01	0	0	5
" -02	0	0	5
" -03	0	0	5
" -04	0	0	5
CM06-29-18-28-01	0	1	4
" -02	1	2	2
" -03	0	3	2
" -04	0	5	0
" -05	0	3	2
" -06	0	3	2
" -07	0	2	3
" -08	0	2	3
" -09	0	3	2
" -10	0	3	2
CM06-29-18-32-01	0	2	3
" -02	0	2	3
" -03	0	0	5
" -04	0	2	3
" -05	0	1	4
" -06	0	0	5
" -07	0	0	5
CM06-29-18-33-01	0	0	5
" -02	0	0	5
" -03	0	0	5
" -04	0	0	5
" -05	0	0	5
" -06	0	0	5
CM11-23-08-01-01	0	0	5
" -02	0	0	5
" -03	0	1	4
" -04	0	0	5
" -05	0	1	4
" -06	0	0	5
" -07	0	0	5
" -08	0	1	4
" -09	0	0	5
" -10	0	0	5
CM11-23-08-05-01	0	2	3
" -02	0	2	3
" -03	0	1	4
" -04	0	2	3
" -05	0	1	4
" -06	0	0	5
" -07	0	0	5
" -08	0	2	3
" -09	0	2	3
CM11-23-08-07-01	0	4	1
" -02	1	1	3
" -03	0	4	1
" -04	1	3	1
" -05	0	5	0
" -06	0	5	0
" -07	0	2	3
" -08	0	4	1

"	-09		0	5	0
CM11-23-08-10-01		3°	0	2	0
"	-02		0	0	5
"	-03		0	0	5
"	-04		0	5	0
"	-05		0	0	5
"	-06		0	0	5
CM11-23-08-13-01			0	3	2
"	-02		0	4	1
"	-03		1	4	0
"	-04		0	4	1
"	-05		0	3	2
"	-06		0	4	1
"	-07		0	1	4
"	-08		0	4	1
"	-09		0	4	1
"	-10		0	2	3
CM11-23-08-17-01			0	0	5
"	-02		0	0	5
"	-03		0	0	5
"	-04		0	0	5
"	-05		0	1	4
"	-06		0	0	5
"	-07		0	0	5
"	-08		0	1	4
"	-09		0	0	5
CM11-23-08-21-01			0	2	3
"	-02		0	4	1
"	-03		0	5	0
"	-04		1	4	0
"	-05		0	2	3
"	-06		0	4	1
"	-07		0	5	0
"	-08		1	2	2
"	-09		1	4	0
"	-10		0	4	1
CM11-23-08-25-01			0	1	4
"	-02		0	2	3
"	-03		0	3	2
"	-04		0	3	2
"	-05		0	4	1
"	-06		0	1	4
"	-07		0	3	2
"	-08		0	3	2
"	-09		1	1	3
"	-10		0	3	2
CM11-23-08-32-01			0	4	1
"	-02		0	4	1
"	-03		0	4	1
"	-04		0	1	4
"	-05		0	2	3
"	-06		0	3	2
"	-07		0	3	2
"	-08		1	3	1

"	-09	0	3	2
"	-10	0	0	5
CM11-23-08-34	-01	1	4	0
"	-02	1	4	0
"	-03	2	3	0
"	-04	1	3	1
"	-05	0	5	0
"	-06	1	4	0
"	-07	1	3	1
"	-08	1	3	1
"	-09	2	3	0
CM11-23-08-36	-01	0	0	5
"	-02	0	0	5
"	-03	0	0	5
"	-04	0	0	5
"	-05	0	1	4
"	-06	0	0	5
"	-07	0	0	5
"	-08	0	1	4
"	-09	0	0	5
"	-10	0	0	5
CM11-23-08-42	-01	0	0	5
"	-02	0	0	5
"	-03	0	0	5
"	-04	0	0	5
"	-05	0	0	5
CM11-23-08-44	-01	0	0	5
"	-02	0	1	4
"	-03	0	0	5
"	-04	0	0	5
"	-05	0	0	5
"	-06	0	0	5
"	-07	0	0	5
"	-08	0	0	5
CM11-23-08-53	-01	0	3	2
"	-02	0	2	3
"	-03	0	0	5
"	-04	0	0	5
"	-05	0	1	4
"	-06	0	1	4
"	-07	0	1	4
"	-08	0	2	3
"	-09	0	1	4
CM11-23-08-63	-01	0	0	5
"	-02	0	0	5
"	-03	0	0	5
"	-04	0	0	5
"	-05	0	0	5
"	-06	0	0	5
"	-07	0	0	5
"	-08	0	0	5
"	-09	0	1	4
CM11-23-08-64	-01	0	5	0

"	-02		0	3	2
"	-03		0	4	1
"	-04		2	3	0
"	-05		0	3	2
"	-06		0	1	4
"	-07		0	4	1
"	-08		0	4	1
CM11-23-08-69-01			0	0	5
"	-02		0	0	5
"	-03		0	0	5
"	-04	1*	1	1	2
"	-05		0	1	4
"	-06		0	0	5
"	-07		0	0	5
"	-08		0	1	4
CM11-23-08-76-01			0	0	5
"	-02		0	0	5
"	-03		0	0	5
"	-04		0	0	5
"	-05		0	0	5
"	-06		0	0	5
"	-07		0	0	5
"	-08		0	1	4
"	-09		0	0	5
"	-10		0	1	4
CM13-08-12-06-01			0	4	1
"	-02		4	1	0
"	-03		0	4	1
"	-04		0	3	2
"	-05		0	3	2
"	-06		0	3	2
"	-07		0	3	2
CM13-08-12-12-01			0	0	5
"	-02		0	1	4
"	-03		0	0	5
"	-04		0	0	5
"	-05		0	0	5
"	-06		0	0	5
"	-07		0	0	5
CM13-08-12-14-01		5*	0	0	0
"	-02	4*	0	0	1
"	-03	4*	0	1	0
"	-04	5*	0	0	0
"	-05	5*	0	0	0
"	-06	3*	0	2	0
"	-07		0	3	2
"	-08	5*	0	0	0
"	-09		0	1	4
CM13-08-12-17-01			0	3	2
"	-02		0	4	1
"	-03		0	5	0
"	-04		0	5	0
"	-05		1	1	3
"	-06		3	2	0

"	-07		0	5	0
"	-08		0	5	0
"	-09		3	1	1
"	-10		0	4	1
CM13-08-12-26	-01		2	2	1
"	-02		4	1	0
"	-03	1*	4	0	0
"	-04		2	3	0
"	-05		3	1	1
"	-06	1*	4	0	0
CM13-08-12-35	-01		0	1	4
"	-02		0	0	5
"	-03		1	0	4
"	-04		0	0	5
"	-05		0	0	5
"	-06		0	0	5
"	-07		0	0	5
"	-08		0	0	5
CM13-08-12-60	-01		4	1	0
"	-02		4	1	0
"	-03		5	0	0
"	-04		5	0	0
"	-05		5	0	0
"	-06		4	1	0
"	-07		2	3	0
"	-08		5	0	0
CM14-37-07-17	-01		1	3	1
"	-02		1	2	2
"	-03		1	2	2
"	-04		1	4	0
"	-05		0	2	3
"	-06		3	1	1
"	-07		0	0	5
"	-08		0	1	4
CM14-37-07-18	-01		1	3	1
"	-02		0	2	3
"	-03		0	5	0
"	-04		4	1	0
"	-05		0	2	3
"	-06		3	1	1
"	-07		2	3	0
"	-08		5	0	0
"	-09		2	3	0
"	-10	1*	1	3	0
CM14-37-07-19	-01		0	0	5
"	-02		0	0	5
"	-03		0	0	5
"	-04		0	0	5
"	-05		1	0	4
"	-06		0	1	4
CM14-37-07-20	-01		0	0	5
"	-02		1	1	3
"	-03		0	0	5

"	-04	0	0	5
"	-05	0	1	4
"	-06	0	0	5
"	-07	0	0	5
"	-08	0	0	5

* 감소의 경향이 보이지 않음

LPR 3계통(CM06-29-18-33-01, CM11-23-08-36-07, CM14-37-07-19-06)과 일품벼 parent의 피틴산 함량은 Table 6에 나타내었으며 HVPE pattern은 Figure 5에서 보여주고 있다. 일품 parent에는 약 3.9%의 피틴산이 함유되어 있었으며, LPR 3계통은 각각 92%와 89.5%, 76.1%의 피틴산 감소율을 보였다. 스크리닝된 이들 M4 seed는 수량이 많은 점과 LPR로의 고정율이 높게 나타나고 있으므로 M5 seed부터는 대량생산을 시도하였다.

Table 6. Content of phytate in Ilpum parent and LPR mutant(M4 seed)

Strains	Phytate (mg/g brown rice powder)
Ilpum parent	12.93
CM06-29-18-33-01	1.04
CM11-23-08-36-07	1.36
CM14-37-07-19-06	3.09

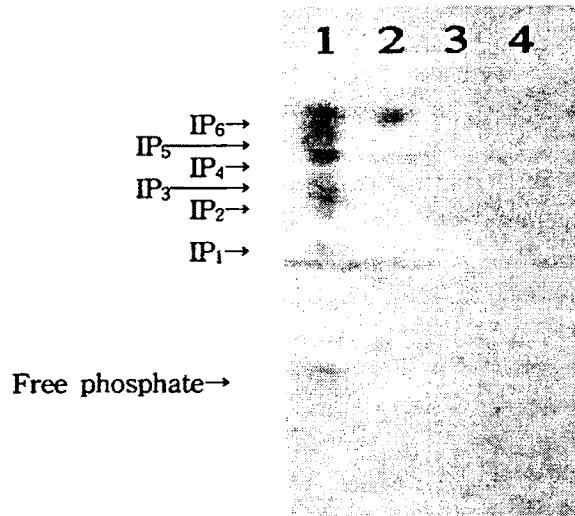


Figure 5. HVPE of phytate extracted from Ilpum parent LPR mutants(M₄ seed)
 Lane 1: Hydrolyzed phytate(IP₁-IP₆), 2: Ilpum parent,
 3: CM06-29-18-33-01, 4: CM14-37-07-19-06

라. M₄ mutant의 증식

현재 M₅ seed는 현재 58계통에 대해 700kg의 수확량을 확보하였으며 이러한 대량 생산은 아직까지 미흡한 식품학적 적성을 살피는 반면 종자로서의 유지를 위한 이용가치가 높을 것으로 기대된다. Wade reagent를 이용한 비색법(Table 7)과 HVPE를 통해(Figure 6) 피틴산의 감소여부를 확인하였다.

Table 7. Content of phytate in Ilpum parent and LPR mutant(M₅ seed)

Strains	Phytate (mg/g brown rice powder)
Ilpum parent	11.59
CM06-29-18-33-01-02	1.10
CM11-23-08-36-07-09	1.36
CM14-37-07-19-06-17	3.05

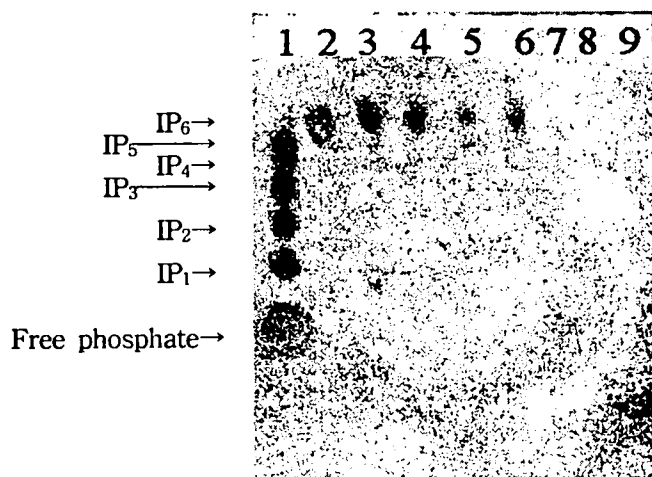


Figure 6. HVPE of phytate extracted from Ilpum parent and LPR mutants(M₅ seed)
 Lane 1: Hydrolyzed phytate(IP₁-IP₆), 2: Phytate 40 μ g, 3: Phytate 20 μ g,
 4: Phytate 10 μ g, 5: Phytate 5 μ g, 6: Ilpum parent, 7: CM06-29-18-33-01-02,
 8: CM11-23-08-36-07-09, 9: CM14-37-07-19-06-17

3. 피틴산 생합성 경로의 해명

가. 반응물과 생성물의 분리

반응물과 생성물은 인의 결합 숫자에 따라 쉽게 분리를 할 수 있으나 생성물의 양이 적으므로 반응물은 ^{14}C 이나 ^3H 으로 label한 inositol, L-myo-inositol-1-phosphate, D-glucose, D-glucose-6-phosphate 등을 사용하여 생성물을 scintillation counter로 검출하였다. 각각의 방법에 따라 장단점이 있어 목적에 따라 생성물의 분리 동정 및 정량에 사용하였다.

1) HPLC

분리에 사용한 column은 WAX와 SAX로서 인의 결합 숫자가 커 질수록 늦게 용출되는 공통적인 양상을 보였으며 전형적인 chromatogram은 Figure 7에 나타나 있다.

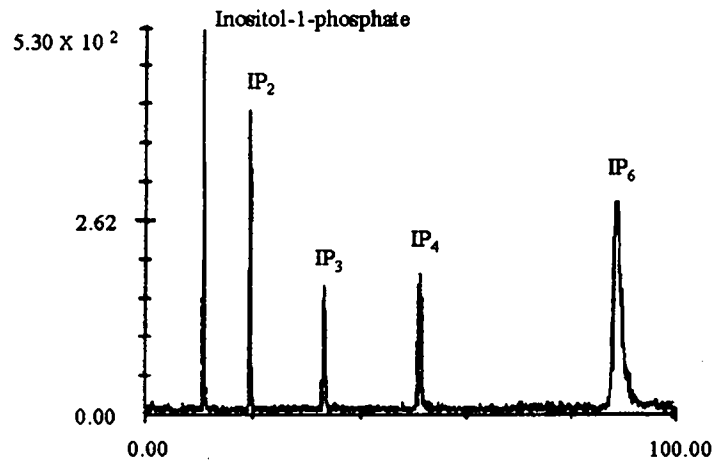


Figure 7. SAX column chromatogram (Standards)

WAX column의 경우에는 비교적 낮은 염농도에서 용출이 가능하였으나 peak가 넓어져 정확한 정량이 곤란한 단점이 있었다(Figure 8, 9). 그러나 inositol이나 phytate에 이르는 화합물의 pattern을 분석하기에는 시간이 절약되는 이점을 가지고 있었다.

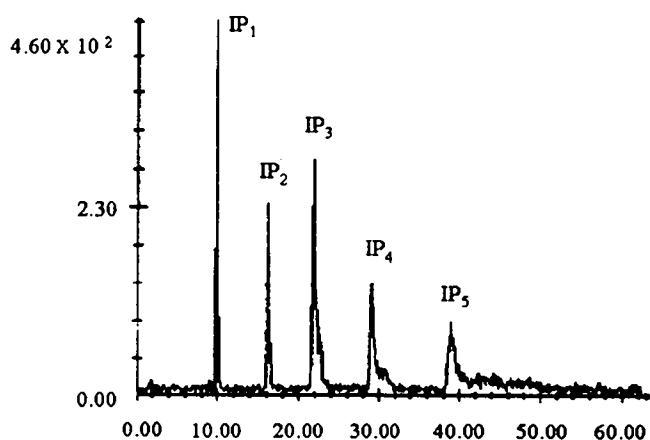


Figure 8. WAX column chromatogram (Standards)

한편, SAX column의 경우에는 화합물과 matrix간의 ion결합력이 WAX보다 강하므로 화합물의 용출에는 높은 ion강도가 필요하나 저급 IPs의 경우 peak의 모양이 선명하여 효소의 활성을 측정하기에는 적합한 이점이 있었다. HPLC 에 의한 생성물의 정량은 chromatography마다 필요한 시간이 있으므로 많은 시료를 처리하기에는 많은 시간이 소요된다는 점, 시료당 처리비용이 많이 든다는 점, 많은 량의 방사성 폐기물이 생성된다는 단점이 있으나 1회 주입할 수 있는 시료의 양이 지금 까지 개발 된 방법 중에서 가장 많고, 화합물의 분리력이 높아 생성물을 정확하게 정량할 수 있다는 장점이 있어 본 실험의 주된 정량방법으로 사용하였다.

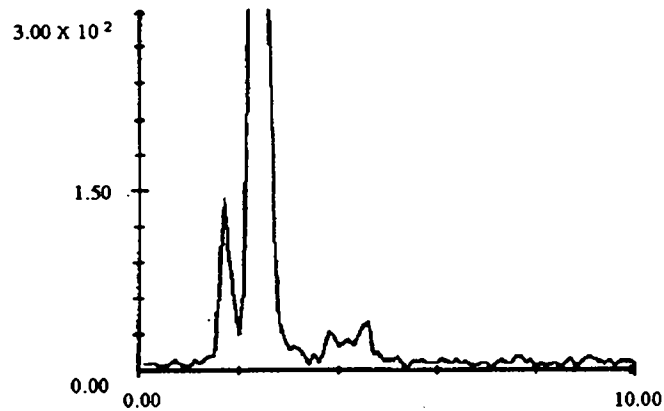


Figure 9. Analysis of inositol phosphates by WAX column chromatography

2) Bio-Rad AG 1X8 Column Chromatography

HPLC에 의한 생성물의 정량법중 가장 큰 단점은 다수 시료를 동시에 처리 할 수 없다는 점이다. 따라서 다수 시료를 동시에 처리 할 수 있는 방법의 개발을 목표로 AG 1X8 mini column을 이용하여 반응물과 생성물의 분리를 시도하였다. 기질인 L-myo-inositol-1-phosphate와 그 분해물인 inositol은 낮은 염농도에서 용출이 되어 쉽게 생성물과 분리를 할 수 있었다.

그러나 기질과 생성물을 완전히 분리를 하기 위하여서는 더 많은 량의 0.2 M ammonium formate로 세척을 하여야 하나 이 경우 scintillation counting을 하여야 하는 시료의 량이 많이 늘어 나는 단점이 있다. Figure 10에서와 같은 조건으로 생성물을 정량할 경우 비교적 높은 background로 생성물의 량을 정확히 측정하기에는 곤란한 점이 있었다. 그러나 조건을 더욱 검토를 하면 단시간에 많은 시료를 처리 할 수 있는 방법으로서의 가능성을 가지

고 있다.

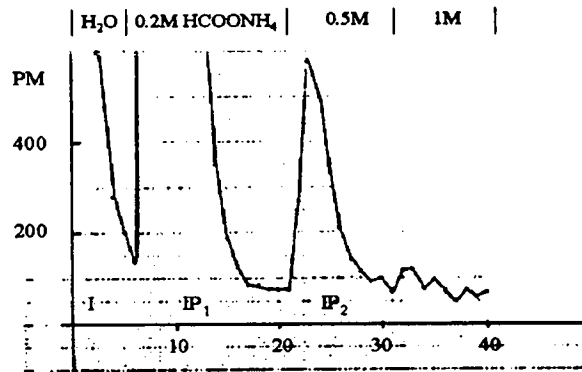


Figure 10. Analysis of inositol phosphates by AG 1×8 column chromatography

나. 효소 활성의 분포

우선 종자 내의 효소 활성의 분포를 검토하기 위하여 밀 (품종: Newana 및 Fortuna) 종자를 배아와 배유 부분으로 나눈 후 25 mM HEPES(pH 7.0)를 가하여 ice bath 상의 pestle에서 homogenize하였다. Homogenate를 4℃, 12,000g에서 20 분간 원심분리한 후 상등액에 대하여 IP₁ kinase의 활성을 측정하였다. 그 결과, 배유 부분에는 효소의 활성이 존재하고 있으나 미약하였다. 반면 배아 homogenate 상등액에는 효소의 활성이 강하게 나타났다. 이는 종자의 성숙기간 중 1 주일 간격으로 채취한 시료 모두에서 공통적으로 나타나는 결과로서 phytate 합성의 초기 단계는 배아 부분에서 많이 일어나고 있음을 나타내 주고 있다.

다. 효소 추출방법

앞의 실험에서 나타난 바와 같이 IP₁ kinase 의 활성은 배아에서 높게 나타났으므로 밀 종자로부터 배아를 분리하여 고농도의 염, 유기 용매, 계면 활성제 및 효소처리가 IP₁ kinase 의 추출에 미치는 영향을 검토하였다. 본 효소는 0.3M NaCl, acetone, 비 이온성 계면 활성제 (Triton X-100, Triton X-114), phospholipase C 등의 처리에 의해 아무런 영향을 받지 않으므로 가용성 단백질을 알았다.

라. 여러 가지 화학물질의 영향

조효소액 중에 혼재해 있는 phosphoesterase, protease등 효소의 활성에 직, 간접적으로 미칠 영향을 최소화하기 위하여 지금까지 알려져 있는 phosphoesterase, protease등의 활성 저해제 및 IP₁ kinase의 활성화제로서의 가능성이 있는 calmodulin, dithiothreitol(DTT)등을 효소 반응액에 첨가하여 그 영향을 살펴보았다.

Table 8. Effect of various chemical compounds on enzyme activity

Chemical compound	Relative activity(%)
Control	100
50mM KCl	108
1mM EGTA	111
0.2mM pMSF	100
1mM DTT	42
10mM LiCl	109
0.1mM VO ₄ ⁻³	102
1mM NaF	120
1mM Na ₂ MoO ₄	61

Table 9. Effect of Calmodulin on enzyme activity

Calmodulin	Relative activity(%)
Control	100
1 μ m Calmodulin, 2 μ m Ca ²⁺	103
2 μ m Ca ²⁺	104
1 μ m Calmodulin	93

Table 8, 9에 나타낸 바와 같이 각종 저해제 및 활성화제는 효소의 활성화에 큰 영향을 주지 못하였다. 특히 본 효소와 비슷한 기질 특이성을 같은 phosphatidylinositol phosphate kinase는 calmodulin에 의하여 효소가 활성화되나 본 효소는 calmodulin의 영향을 받지 않아 이들 두 효소의 작용 mechanism이 크게 다를 것을 시사하고 있다.

마. 효소의 정제

IP₁ Kinase의 활성이 배아에 높게 편재해 있음은 앞의 실험에서 밝혀졌으나 밀로부터 배아만을 분리 정제하기가 현실적으로 불가능하였으므로 효소의 정제를 위한 재료로는 시판 精製 밀 胚芽(stone grinding, 품종 미상)를 사용하였다. 효소 활성의 존재 유무를 확인하기 위하여 밀(품종, Newana 및 Fortuna)로부터 배아를 분리하여 효소 활성을 비교한 결과 거의 같은 수준의 활성을 나타내어 효소 정제의 시료로 하였다.

1) 조효소액의 batch처리

밀의 배아는 많은 량의 지질을 함유하고 있으므로 배아 homogenate를 그대로 column chromatography에 도입시키는데에는 여러 가지 문제점이 있다. 따라서 조효소액을 batch처

리하여 지질 및 기타 가용성 단백질을 제거하여야 할 필요가 있다. 현재 보편적으로 사용하고 있는 batch처리법을 검토하여 보았다.

가) Cold Acetone Fractionation

조효소액에 -10°C 로 냉각한 acetone을 서서히 가하여 0 - 20 %, 20 - 40 %, 40 - 60 %, 60 - 80 % 의 분획을 각각 원심분리하여 얻었다. 침전물을 감압하에 건조시켜 acetone을 제거한 후 소량의 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) buffer에 녹인 후 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 0 - 20 % fraction에서만 미미한 활성을 나타내었고 20 % 이상에서는 활성이 전혀 나타나지 않아 acetone fractionation은 적절한 방법이 아님을 알았다.

나) Ammonium Sulfate Fractionation

조효소액에 분말 ammonium sulfate를 서서히 가하여 0 - 20 %, 20 - 40 % saturation 분획과 상등액을 각각 원심분리하여 얻었다. 침전물을 소량의 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) buffer에 녹인 후 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 0 - 20 % fraction에서만 미미한 활성을 나타내었을 뿐 40 % 분획과 상등액에서는 활성이 전혀 나타나지 않아 ammonium sulfate fractionation은 적절한 방법이 아님을 알았다.

다) Polyethylene Glycol(PEG) Fractionation

조효소액에 분말 PEG를 서서히 가하여 0 - 5 %, 5 - 10 %, 10 - 20, 20 - 30 % 분획과 상등액을 각각 15,000g로 80분간 원심분리하여 얻었다. 침전물을 소량의 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) buffer에 녹인 후 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 10에 나타난 바와 같이 수율은 20 % 내외로 그다지 높지 않은 편이었으나 시료의 양이 대폭 축소되어 그 나름대로의 성과가 있었다.

Table 10. Yield of PEG fraction

	Yield (%)
Crude extract	100
10 - 20%	9
20 - 30%	20

2) 각종 Column Chromatography 조건 검토

가) IPs의 조제

Na-Phytate 10g을 소량의 물에 녹인 후 pH를 4.0으로 조절한 후 물을 가하여 100 mL로 하였다. 이를 autoclave에서 121 °C, 30분간 가열한 후 냉각시켜 pH를 7.0으로 조절하였다. 이중 반응을 취하여 AG 1X8 ion exchange column(20 mL)에 도입한 후 0 - 1.5 N HCl(total 500 mL)로 용출시켰다. 각 분획은 HVPE로 확인하여 IP₄ - IP₅가 용출된 분획을 동결 건조하였다.

나) IPs-Sepharose의 합성

동결 건조한 IP₄ - IP₅ fraction 140 mg을 Epoxy Sepharose 2 g과 혼합한 후 40°C에서 overnight shaking하여 inositol phosphate의 free OH group을 Sepharose에 coupling시켰다. 이를 1 M ethanolamine과 5시간 실온에서 반응시켜 미반응 epoxy기를 blocking시켰다 (Figure 11).

Epoxy Sepharose 2.0g

- wash with distilled water(500mL)
- mix IPs(140mg)
- adjust pH
- shake at 37°C for 18hr
- wash with distilled water(150mL)
- sediment at 1M ethanolamine for 5hr
- wash with 100mM Tris-HCl(pH9.2)(200mL)
- wash with 100mM Na-acetate(pH3.5)(200mL)

↓
equilibrate with buffer

Figure 11. Synthesis procedure of IPs-Sepharose

다) Ca-Phytin의 합성

Na-Phytate 10 g을 50 mL의 물에 녹인 후 50 % CaCl₂ 용액 40 mL를 서서히 가하여 침전을 형성한다. 이를 1 시간 방치하여 침전이 숙성되게 한 후 10,000g 에서 10 분간 원심분리하여 침전을 분리한 후 증류수로 세척하였다. 침전을 원심분리로 모은 후 ethanol로 2회 세척하여 수분을 제거한 후 침전을 50°C oven에서 건조시켰다.

라) Mini Column Chromatography

DEAE-Cellulose, DEAE-Sepharose, Q-Sepharose, Phenyl Sepharose, Octyl Sepharose, P-Cellulose, Blue Sepharose, CM-Cellulose, 5'AMP-Sepharose, Red-120 Agarose,

Ca-Phytin, IPs-Sephарose를 각각 1 mL씩 mini column에 충전하고 조효소액을 apply하여 small scale에서 chromatography를 하였다. 그 결과 DEAE-Cellulose, DEAE-Sephарose, Q-Sephарose등과 같은 음이온 교환수지 및 Phenyl Sephарose, Octyl Sephарose등과 같은 소수성 matrix에는 효소의 활성이 흡착되었으나 활성이 있는 상태로 용출이 되지 않는 않았다. P-Cellulose, CM-Cellulose와 같은 양이온 교환수지 및 5'AMP Sephарose, Ca-Phytin, IPs-Sephарose등과 같은 affinity matrix에도 단백질이 거의 흡착되지 않아 chromatography로서의 의미가 없었다. 한편 Red-120 Agarose에는 효소의 흡착 및 용출이 되었다.

마) 효소의 정제

시판 stone grind wheat germ 50 g에 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)를 가하고 유발에서 균질화 하였다. 이를 15,000g로 30분간 원심분리하여 상등액과 잔사를 분리하고 잔사에 냉각한 buffer를 가하고 균질화 한 후 다시 원심분리하여 앞의 상등액과 합하여(270mL) 조효소원으로 하였다. 조효소액에 분말 PEG를 23 %가 되게 가한 후 30분간 방치하여 침전을 숙성시켰다. 이를 15,000g에서 30분간 원심분리한 후 상등액에 다시 분말 PEG를 가하여 최종 농도가 30 %가 되게 한 후 30분간 방치하였다. Ice bath에서 30분간 방치한 후 15,000g에서 90분간 원심분리하여 침전을 얻었다. 침전을 소량의 buffer에 현탁시킨 후 같은 buffer에 대하여 24시간 투석을 하였다. 투석물(23mL)을 buffer로 완충화한 Red-120 Agarose column(15mL)에 도입한 후 50 mL의 buffer로 세척한 후 0 - 0.5 M NaCl(total 400mL) linear gradient로 용출하였다. 활성은 일부는 흡착이 되었으나 일부는 약하게 흡착이 되어 void volume이 조금 지난 후부터 용출이 되었다. 흡착이 된 효소는 활성이 있는 상태로 용출을 할 수가 없었다. 활성이 있는 부분은 모아(15.5 mL) ATP Agarose(1 mL)에 도입하고 buffer(10 mL), 200 mM NaCl(10 mL), 4 mM inositol-1-phosphate(10 mL), 0.5 % Triton X-100(10 mL)로 순차적으로 용출하였다. 그러나 활성은 이상의 어떠한 용출제로도 용출할 수가 없었다. 이상의 정제 과정을 요약하면 Table 11과 같다.

Table 11. Purification of enzyme

Step	Protein (mg)	Total activity (cpm/min)	Specific activity (cpm/min/mg)	Yield (%)	Fold
Crude	3510	799220	277.7	100	1
23-30% PEG	48.3	63173	1308	8	4.7
Red-120	1.5	21803	14535	2.7	52

바. In vitro에서 myo-inositol 또는 L-myo-inositol-1-phosphate로부터 higher inositol phosphate의 합성

5 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 50 mM HEPES(pH 7.0), ATP regeneration system과 기질로는 ¹⁴C Inositol-1-phosphate 또는 ¹⁴C inositol(0.2 uCi씩)를 가하고 효소원으로는 Fortuna crude extract 95 μl(반응액 총량 150 μl)를 가하여 30°C에서 150분간 반응시킨 후 20 % TCA 30 μl를 가하여 반응을 정지시켰다. 원심분리를 하여 단백질을 침전시킨 후 상등액 200 μl를 HPLC로 분석하였다. HPLC분석 조건은 실온에서 SAX column을 사용하여 0 - 1 M ammonium phosphate linear gradient로 용출하였다. Figure 12에 나타난 바와 같이 inositol을 출발 기질로 하였을 때에는 inositol monophosphate를 검출 할 수 있었으나 higher inositol phosphates는 검출 할 수 없거나 거의 흔적량만이 검출되었다. 한편 inositol-1-phosphate를 출발 물질로 하였을 경우에는 inositol-1-phosphate 및 inositol phosphates로부터 탈인산화 되어 생성한 inositol과 IP₂로부터 IP₆까지 고르게 검출할 수 있었다(Figure 13).

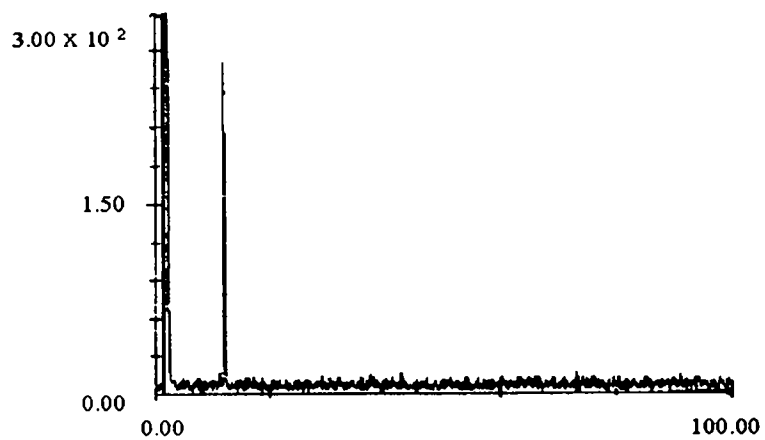


Figure 12. Synthesis of inositol phosphate from inositol

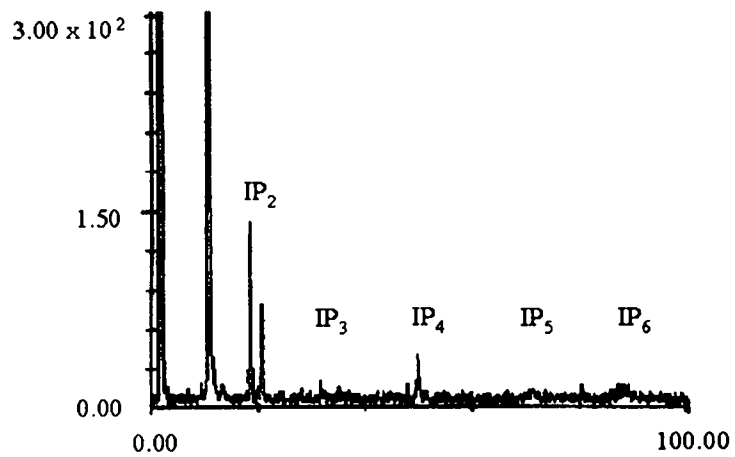


Figure 13. Synthesis of inositol phosphates from inositol-1-phosphate

Inositol-1-phosphate의 생합성 경로로는 inositol로부터 kinase에 의한 직접적인 인산화 과정 및 glucose-6-phosphate로부터 inositol phosphate synthase에 의한 cyclization과정을 통한 경로가 알려져 있다. 본 실험에서는 두 단계의 과정, 즉 inositol의 직접적인 인산화로 생성된 inositol monophosphate와 inositol monophosphate의 다 단계에 걸친 인산화의 결과 inositol hexakisphosphate에로의 합성 전 과정을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 피틴산의 합성이 inositol phosphate의 직접적인 인산화에 의해 이루어진다는 것을 한눈으로 설명할 수 있다. 비슷한 결과는 amoeba에 있어서도 나타나나 amoeba의 경우에는 inositol monophosphate와 피틴산의 축적만이 현저하여 피틴산의 생성과정이 서로 다를 수 있음을 암시하고 있다. 본 연구 결과로 식물체에서 inositol monophosphate가 직접적인 인산화에 의해 피틴산이 생성됨을 처음으로 밝혀지게 되었다.

사. LPR의 피틴산 합성 대사 특성

LPR mutant 및 parent의 total phosphate, free inorganic phosphate, 피틴산의 인산 함량을 각각 측정하였다(Table 12). Total phosphate 함량의 변화는 LPR mutant와 parent에 있어 차이가 없었으나 free inorganic phosphate 및 피틴산의 함량에는 현격한 차이가 나타나 mutant에서는 free inorganic phosphate의 함량이 높고 피틴산의 함량은 낮은 반면 parent에서는 free inorganic acid의 함량이 낮으나 반면 피틴산의 함량이 높게 나타나고 있다. 즉 mutant는 피틴산 생합성 경로에 변이가 일어난 결과 피틴산으로 합성되어야 할 무기인산이 그대로 유리상태로 존재하기 때문에 유리 무기인산의 양이 증가 한 것으로 판단 할 수 있다. 따라서 mutant와 parent의 in vitro에서 피틴산 생합성 능력의 차이를 검정하고자 하였다.

LPR mutant와 parent가 출수한 날로부터 15일, 25일 경과한 벼를 채취하였고 일품벼 LPR은 각각 55%와 95%이상 피틴산의 함량이 낮아진 두 계통을 선택하여 채취하였다. 각각의 시료에 10 mM HEPES (pH 7.0)를 400 μ l가하여 pestle에서 균질화 한 후 원심분리하여 상등액을 조효소원으로 하였다. 400mM ATP, 6 mM MgCl₂, 50 mM HEPES(pH 7.0), 기

질로는 200mM inositol-1-phosphate를 가하고 crude extract 20 μ l(반응액 총량 50 μ l)를 가하여 30 °C에서 150분간 반응시킨 후 20 % TCA 30 μ l를 가하여 반응을 정지시킨 후 HVPE를 이용하여 분석하였다.

Table 12. Content of phosphate contained in Ilpum parent and LPR mutant(M₅ seed)

Strains	Total phosphate	Phosphate in phytate	Free phosphate
	(mg/g brown rice powder)		
Ilpum parent	38.59	22.13	0.93
CM11-23-08-36-01-06	45.30	2.51	36.59
CM13-08-12-60-01-24	41.73	7.30	20.91
CM11-23-08-34-01-06	40.75	3.59	32.88
CM11-23-08-25-01-06	48.53	3.20	40.43
CM05-24-19-14-05-04	41.08	2.94	34.25

HVPE 상으로는 inositol과 inositol-1-phosphate로부터의 피틴산 중간 생성물인 myo-inositol-diphosphate, -triphosphate, -tetrphosphate, -pentaphosphate의 생합성은 확인하지 못하였다. 이는 HVPE의 검출 감도가 생성물을 확인 할 수 있을 정도에는 못 미치기 때문으로 판단하였다. 한편 HVPE의 결과로 보면 개화 일로부터 15일이 지난 벼보다는 25일이 지난 벼에서 ATP의 가수분해가 현저하게 나타나는데 개화한지 15일이 지난 벼는 ATP가 감소하여 상당량의 ADP와 약간의 AMP로 가수분해되는 것으로 확인되었다. 그러나 개화한지 25일 된 벼에서는 대부분의 ATP가 가수분해되어 ADP로 남아 있었으며, 약간의 AMP도 존재하였다(Figure 14).

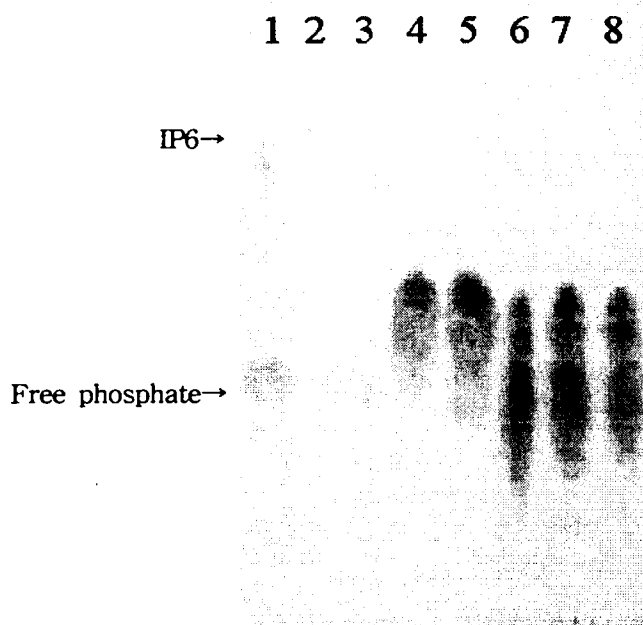


Figure 14. HVPE of inositol phosphate biosynthesis by crude extract of *Ipum* parent and LPR mutants(M_4 seed)

Lane 1: Hydrolyzed phytate(IP_1 - IP_6), 2: Phytate, 3: Crude extract,
 4: ATP + IP_1 5: ATP +myo-Inositol, 6: ATP + IP_1 +crude extract
 7: ATP +myo-Inositol +crude extract, 8: ATP +crude extract

아. LPR mutant와 parent에 의한 higher inositol phosphates의 생합성

Mutant와 parent를 각각 반으로 잘라 배아가 붙어 있는 부분은 보관을 하고 나머지 반쪽 부분의 피틴산 함량을 확인한 후 배아가 붙어 있는 반쪽 부분에 10 mM HEPES (pH 7.0)를 200 μ l가하여 pestle에서 균질화 한 후 원심분리하여 상등액을 조효소원으로 하였다. 5 mM ATP, 6 mM $MgCl_2$, 50 mM HEPES(pH 7.0), ATP regeneration system과 기질로는

^{14}C Inositol-1-phosphate(0.2 uCi씩)를 가하고 crude extract 140 μl (반응액 총량 220 μl)을 가하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 150분간 반응시킨 후 20 % TCA 30 μl 를 가하여 반응을 정지시켰다. 원심분리하여 단백질을 침전시킨 후 상등액 200 μl 를 취하여 HPLC로 분석하였다. 분석 조건은 SAX column을 사용하여 0.08 - 0.75 M ammonium phosphate gradient로 1 mL/min의 유속으로 35분간 행하였다.

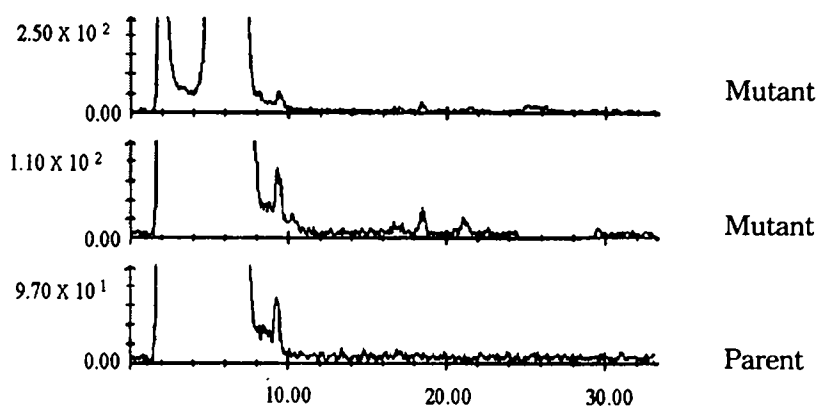


Figure 15. Analysis of phytate extracted from LPR mutant and parent

변이주와 야생주의 phytate합성 능력의 분석 결과는 Figure 15과 같다. LPR mutant 에서는 inositol phosphates의 합성을 관찰할 수 있었으나 parent에서는 그의 합성을 관찰할 수 없었다. LPR 시료의 제한으로 옥수수외 저 피틴산 돌연변이체를 이용한 피틴산 생합성을 병행하였다. 옥수수의 저 피틴산 돌연변이체의 배아를 분리하여 10 mM HEPES (pH 7.0)를 가하고 pestle에서 균질화 한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소원으로 하여 피틴산의 생합성 능력을 같은 방법으로 검토를 하였으며 그 결과를 Figure 16에 나타내었다.

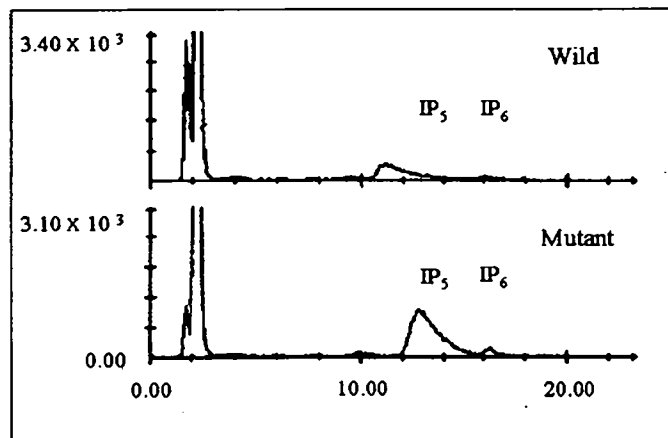


Figure 16. Analysis of phytate extracted from Maize mutant and parent

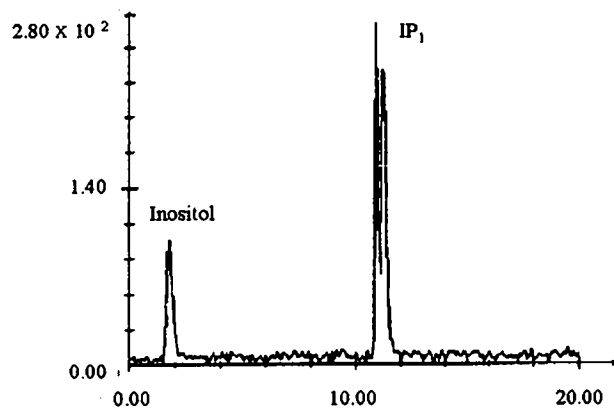


Figure 17. Degradation of IP₂

Figure 17는 ^3H L-myo-inositol- 3,6-bisphosphate가 crude extracts에 의하여 짧은 시간 (20분)에 분해되어 inositol과 inositol monophosphate의 두 가지 isomer가 생성되는 과정을 보여준다. Inositol phosphates는 조직 중에 보편적으로 존재하는 phosphatase 또는 phosphoesterase에 의하여 쉽게 가수분해되어 inositol 또는 저급 inositol phosphates로 변환이 된다. Figure 16의 결과는 변이주의 반응물에 왜 많은 량의 IP_5 , IP_6 가 축적이 되는가를 설명해 준다. 바꾸어 말하면 변이주에서는 phytate합성 경로 및 phytate분해 경로에 모두 변이가 일어났음을 추론 할 수가 있다.

4. LPR의 식품학적 특성

가. 지방산 조성

1) M_3 seed의 지방산 조성

본 연구에 사용할 일품의 M_3 seeds가 아직 고정화되지 않아 표현형이 고르게 나타나질 않고 있다. 따라서 LPR seeds를 획득하기 위하여 자식 증체한 일품의 M_3 돌연변이체를 반으로 잘라 피틴산을 정량하여 피틴산의 함량이 저하된 것만을 골라서 피틴산이 각각 90%, 90-80%, 80-50% 저하한 군으로 분류하였다. 각각의 시료들로부터 지방질을 추출하여 지방산을 gas chromatography법으로 분석하였으며 그 결과를 Table 13에 나타내었다. Table 13에서 알 수 있듯이 지방산의 조성에 있어 parent 와 mutant사이에는 상당한 차이가 나타났다.

2) M_4 , M_5 seed의 지방산 조성

M_3 LPR mutant의 지방산 분석 결과에서는 저급 지방산 함량이 증가된 것이 관찰되었다. 따라서 이러한 변화의 유지를 관찰하기 위하여 M_4 및 M_5 seeds의 지방산 조성을 계속하여

분석하였으며 그 결과를 Table 14, 15에 나타내었다.

Table 13. Composition of neutral lipids extracted from Ilpum parent and LPR mutants(M₃ seed)

	Unk1	14:0	16:0	Unk2	18:0	18:1	18:2	18:3
Ilpum parent	7.1	20.4	14.8	7.2	4.0	22.7	21.1	1.0
CM 05-24-19-14	17.6	6.8	13.5	4.4	3.6	25.7	26.0	1.5
CM 06-29-18-06	14.6	6.4	13.5	4.4	3.8	29.6	24.9	1.6
CM 11-23-08-01	18.4	7.8	13.7	5.8	4.2	26.2	21.4	1.2
CM 11-23-08-02	16.7	7.9	13.4	5.5	4.3	27.4	22.2	1.4
CM 13-08-12-01	18.3	7.3	13.8	5.3	3.7	23.1	26.0	1.2
CM 13-08-12-02	26.6	11.7	11.6	6.4	3.9	19.5	17.8	1.0
CM 14-37-07-17	16.0	6.8	13.1	4.7	3.7	28.1	24.9	1.5

Table 14. Composition of neutral and polar lipids extracted from Ilpum parent and LPR mutants(M₄ seed)

Lipids	Strains	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	24:0
Neutral lipids	Ilpum parent	0.49	19.46	2.24	36.50	38.81	2.15	0.35
	CM06-29-18-33-01	0.58	18.58	2.64	37.49	38.46	1.69	0.56
	CM11-23-08-36-07	0.55	19.06	2.26	38.24	37.26	2.19	0.44
	CM14-37-07-19-06	0.52	18.34	2.72	38.21	37.81	2.03	0.37
Polar lipids	Ilpum parent	0.30	18.30	1.39	38.82	39.02	1.91	0.26
	CM06-29-18-33-01	0.34	16.30	1.52	40.87	38.40	2.26	0.31
	CM11-23-08-36-07	0.33	16.15	1.54	41.50	37.88	2.18	0.42
	CM14-37-07-19-06	0.32	15.73	1.72	41.18	38.74	1.98	0.33

Table 15. Composition of neutral and polar lipids extracted from Ilpum parent and LPR mutants(M₅ seed)

Lipids	Strains	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	24:0
Neutral lipids	Ilpum parent	0.48	17.90	2.28	38.61	38.91	1.18	0.62
	CM06-29-18-33-01-02	0.64	16.74	2.57	40.99	36.88	1.57	0.58
	CM11-23-08-36-07-09	0.49	15.56	2.29	43.93	35.81	1.38	0.52
	CM14-37-07-19-06-17	0.49	16.11	2.21	41.83	37.43	1.50	0.42
Polar lipids	Ilpum parent	0.34	18.30	1.54	39.95	37.89	1.76	0.32
	CM06-29-18-33-01-02	0.30	16.68	1.59	42.07	37.50	1.62	0.38
	CM11-23-08-36-07-09	0.41	16.60	1.68	41.95	38.33	1.87	0.34
	CM14-37-07-19-06-17	0.38	16.38	1.64	41.70	37.71	1.85	0.34

표에서 나타나듯이 M₄ 및 M₅ seeds의 지방산 조성을 분석한 결과 M₃ seeds에서 나온 결과와는 일치하지 않는 결과가 나왔다. 즉, 대조군인 parent와 LPR mutant로부터 추출된 중성지방과 극성지방의 지방산 조성은 커다란 변화를 보여주지 않고 있다. 이와 같은 결과는 M₃ seeds의 지방산을 분석한 시점이 수확 후 9개월이 지난 시점이라는 것이 크게 작용한 것으로 판단된다. LPR의 경우 종실내의 피틴산의 함량이 현격히 낮으므로 무기 양이온들이 피틴상태로 킬레이트 되어있지 않고 유리 상태로 존재하며 조직 내에서의 여러 가지 산화 반응에 관여할 것으로 생각된다. 즉, LPR mutant의 경우 시료의 저장기간이 길어지면서 피틴산과 결합하지 않은 상태로 존재하는 제일철의 산화와 더불어 지방산의 변패도 parent에 비하여 가중되어 진행 된 결과로 판단된다. 이러한 결과로부터 LPR의 저장과 식품학적 성질의 변화에 관한 보다 심중한 검토가 필요한 것으로 판단되어 진다. M₄ 및

M₅ seeds의 지방산 조성은 피틴산 생합성 경로의 교란이 지방산의 생합성 대사에는 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

나. LPR 전분의 이화학적 성질

1) M₃ seed 전분의 이화학적 성질

M₃ LPR mutant와 parent로부터 각각 전분을 추출하여 전분의 이화학적 성질을 관찰하였다. 전분의 일반적인 형태는 큰 차이가 나타나지 않고 있으며 추출한 전분의 정색도에 있어서도 LPR mutant와 parent 사이에 큰 차이점은 발견되지 않았다. 이러한 경향은 M₄ 및 M₅ seeds에서도 같게 나타나 전분의 일반적인 형태, 전분의 정색도, blue value 등에 있어서 LPR mutant와 parent 사이에 큰 차이점은 발견되지 않았다(Figure 18 - 21, Table 16). 따라서 피틴산 생합성 대사의 이상이 전분의 이화학적 성질에는 영향을 주지는 않는 것으로 판단되었다.

Table 16. The blue value of starch extracted from Ilpum parent and LPR mutants

Strains	Blue value
Ilpum parent	0.129
Ilpum mutants	0.109

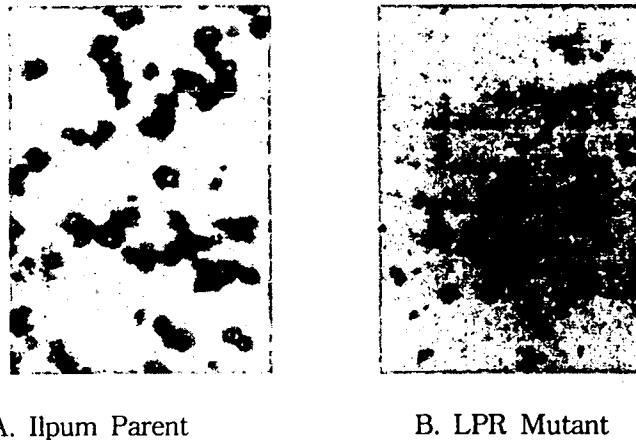


Figure 18. Photograph of starch extracted from Ilpum parent and LPR mutants(M₃ seed)

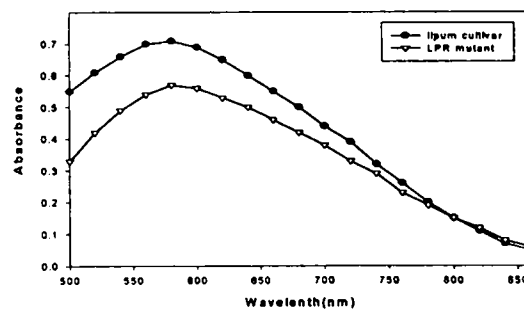


Figure 19. Absorption curve of starch extracted from Ilpum parent and LPR mutants (M₃ seed)

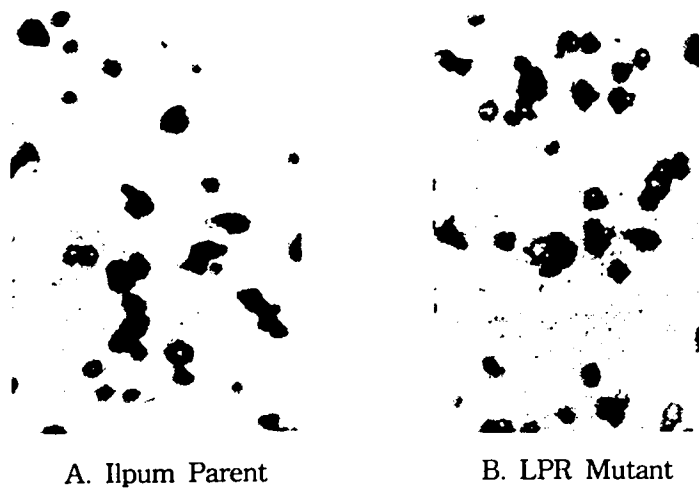


Figure 20. Photograph of starch extracted from Ipum parent and LPR mutants(M₄ seed)

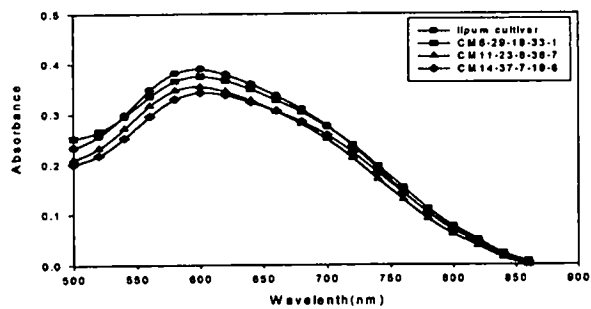


Figure 21. Absorption curve of starch extracted from Ipum parent and LPR mutants (M₄ seed)

다. 단백질의 변화

가용성 단백질의 추출은 Figure 22와 같은 방법으로 순차적으로 추출하여 fractionation하였다.

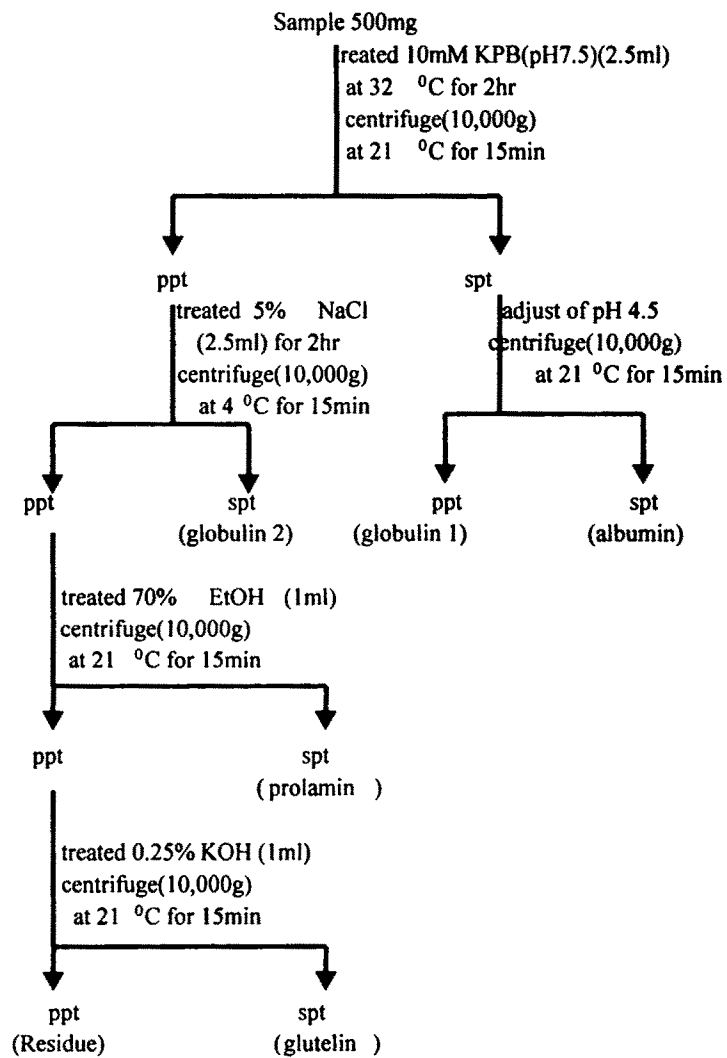


Figure 22. Fractionation procedure of rice protein

한편 acid soluble protein은 시료 500 mg에 1.2% HCl 1.0mL을 가하고 4℃에서 12시간 교반한 후 원심분리하여 얻은 상등액으로 하였다. 이상의 방법으로 추출한 단백질의 각각 fraction의 pattern은 10% SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다(Figure 23-34).

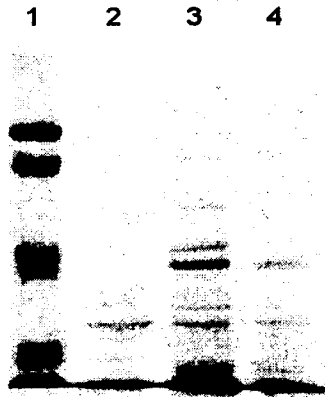


Figure 23. SDS-PAGE of albumin fraction of Ilpum parent and LPR mutants(M₃ seed)
 Lane 1 : Marker protein, 2 : Ilpum parent, 3 : CM06-29-18-33,
 4 : CM14-37-07-19

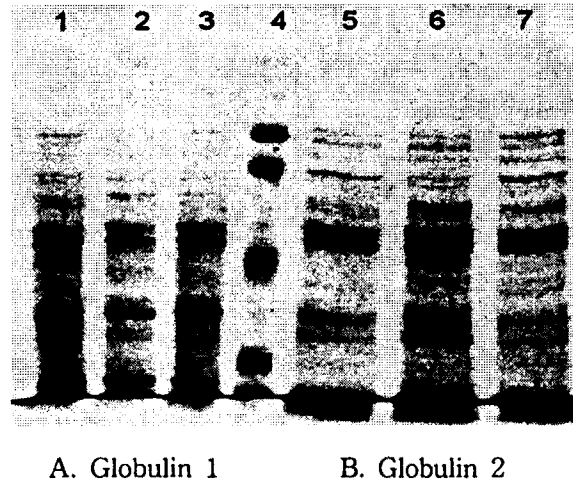


Figure 24. SDS-PAGE of globulin 1 and 2 fraction of Ilpum parent and LPR mutants(M₃ seed)
 Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33, 3: CM14-37-07-19 4: Marker protein
 5: Ilpum parent, 6: CM06-29-18-33, 7: CM14-37-07-19

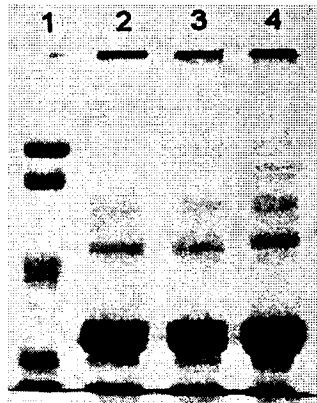


Figure 25. SDS-PAGE of prolamin fraction of Ilpum parent and LPR mutants(M₃ seed)
 Lane 1 : Marker protein, 2 : Ilpum parent, 3 : CM06-29-18-33,
 4 : CM14-37-07-19

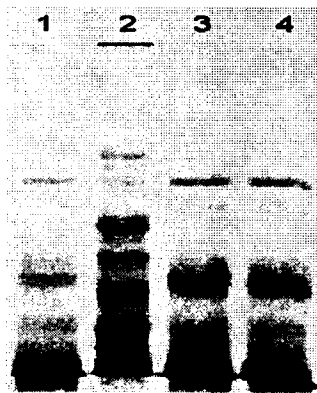


Figure 26. SDS-PAGE of acid soluble protein extracted from Ilpum parent, LPR mutants(M₃ seed), and LPR mutants(M₃ seed) added phytate
 Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33,
 3: Ilpum parent, 4: CM06-29-18-33 + phytate,

결과에서 나타나듯이 albumin, globulin, glutelin 등의 fraction에서는 LPR mutant와 parent의 단백질 pattern에 있어 별다른 차이가 발견되지 않았다(Figure 23-25, 27-29, 31-33). 단지 LPR 돌연변이체와 일품 parent 사이의 각각의 단백질 분획은 대체적으로 추출된 단백질의 양에 의한 차이만 나타났다.

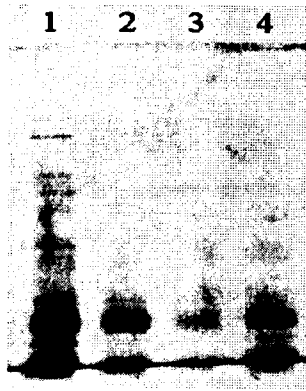


Figure 27. SDS-PAGE of albumin fraction of Ilpum parent and LPR mutants(M₄ seed)
Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33-01, 3: CM11-23-08-36-07,
4: CM14-37-07-19-06

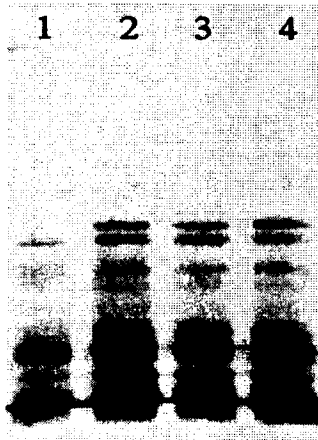


Figure 28. SDS-PAGE of globulin fraction of Ilpum parent and LPR mutants(M₄ seed)
Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33-01, 3: CM11-23-08-36-07,
4: CM14-37-07-19-06

그러나 acid soluble fraction의 경우 LPR mutant와 parent에 있어 커다란 차이를 보여주고 있다(Figure 26,30,34). 즉 LPR mutant의 경우 많은 단백질이 추출되고 있으며 그 양상은 parent의 것과 상당한 차이를 보여주고 있다.

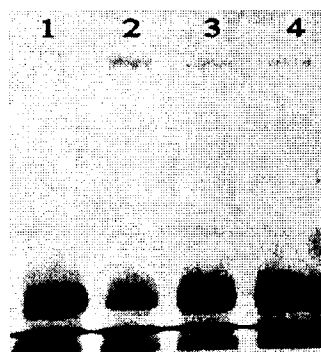


Figure 29. SDS-PAGE of prolamin fraction of Ilpum cultivar and LPR mutants(M_4 seed)
 Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33-01, 3: CM11-23-08-36-07,
 4: CM14-37-07-19-06

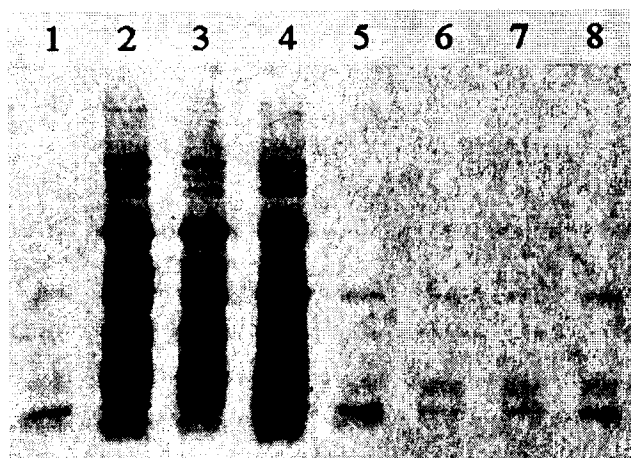


Figure 30. SDS-PAGE of acid soluble protein extracted from Ilpum parent, LPR mutants(M_4 seed), and LPR mutants(M_4 seed) added phytate
 Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33-01, 3: CM11-23-08-36-07,
 4: CM14-37-07-19-06, 5: Ilpum parent, 6: CM06-29-18-33-01 + phytate,
 7: CM11-23-08-36-07 + phytate, 8: CM14-37-07-19-06 + phytate

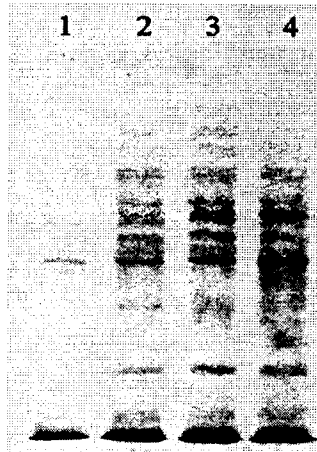
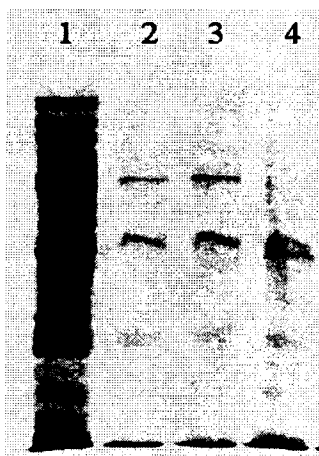
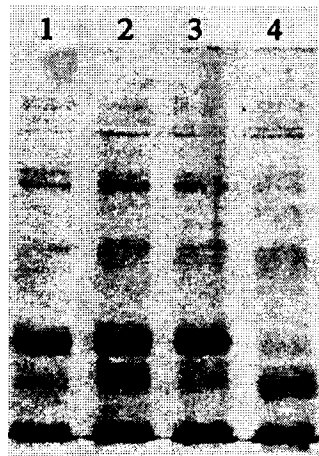


Figure 31. SDS-PAGE of albumin fraction of Ilpum parent and LPR mutants(M₅ seed)
 Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33-01-02,
 3: CM11-23-08-36-07-09, 4: CM14-37-07-19-06-17



A. Globulin 1



B. Globulin 2

Figure 32. SDS-PAGE of globulin 1 and 2 fraction of Ilpum parent and LPR mutants (M₅ seed)

Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33-01-02, 3: CM11-23-08-36-07-09,
 4: CM14-37-07-19-06-17

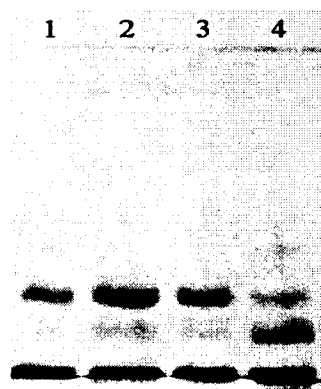


Figure 33. SDS-PAGE of prolamin fraction of Ilpum parent and LPR mutants(M₅ seed)
 Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33-01-02
 3: CM11-23-08-36-07-09, 4: CM14-37-07-19-06-17

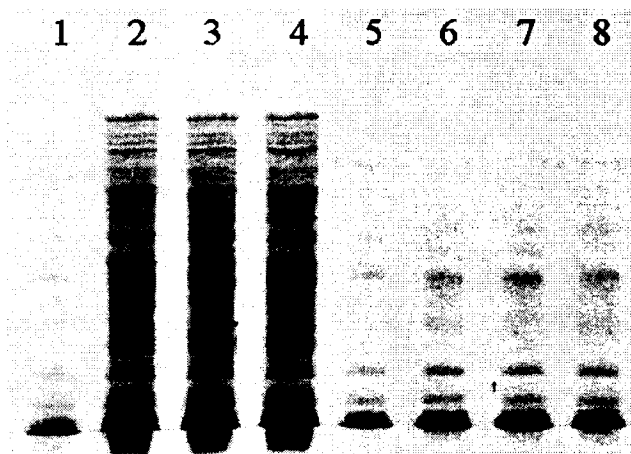


Figure 34. SDS-PAGE of acid soluble protein extracted from Ilpum parent,
 LPR mutants(M₅ seed), and LPR mutants(M₅ seed) added phytate
 Lane 1: Ilpum parent, 2: CM06-29-18-33-01-02, 3: CM11-23-08-36-07-09,
 4: CM14-37-07-19-06-17, 5: Ilpum parent, 6: CM06-29-18-33-01-02 + phytate,
 7: CM11-23-08-36-07-09 + phytate, 8: CM14-37-07-19-06-17 + phytate

일반적으로 피틴산은 조직 내에서 무기물이나 단백질과 결합한 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 단백질의 추출에 미치는 피틴산의 영향을 보기 위하여 LPR mutant에 parent와 같은 수준의 피틴산(final 1.2%)을 가하고 동일한 방법으로 추출하여 acid soluble protein의 pattern을 전기영동으로 관찰하였으며 그 결과를 Figure 26,30,34에 나타내었다. 그림에서 보듯이 피틴산의 첨가에 의해 acid soluble protein의 추출 pattern은 LPR mutant나 parent가 같아지고 있어 단백질의 추출에 있어 피틴산이 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다. 즉, LPR mutant는 같은 조건하에서 더 많은 양의 단백질이 추출되어 유리된다는 것을 알 수 있다. 이는 피틴산이 단백질과의 복합체를 이루어 단백질의 소화 흡수에 영향을 미친다는 보고를 뒷받침 한다고 할 수 있다. Acid soluble protein 추출 결과는 인간의 소화과정에 있어서 피틴산과 단백질이 결합하여 단백질의 소화, 흡수에 직접적인 영향을 미치는 것으로 확인되었으므로 이와 관련한 연구가 신중하게 진행되어야 할 필요가 있다.

제 4 절 고 찰

피틴산이 갖는 생리적 의미는 연구자의 시각에 따라 다르게 표현이 되고 있다. 그러나 현상적으로 나타난 피틴산의 부정적 견해는 많은 연구자들에 의해 호응을 받고 있는 실정이다. 특히 사료용 곡물중의 피틴산은 부영양화를 일으키는 원인 물질로 지목이 되어 구미 및 일본 등에서 사료중의 피틴산의 총량을 규제하는 움직임까지 나타나고 있어 곡물중의 피틴산을 조절하는 기술을 보유하는 것은 앞으로의 곡류 육종에 있어 중요한 기술의 하나로 자리매김 할 것으로 판단하고 있다. 실제로 미국의 USDA에서는 옥수수를 위시하여 쌀, 콩, 밀, 보리 등의 작물로부터 저 피틴산 돌연변이체를 유기하고자 심혈을 기울이고 있다. 현재 옥수수의 경우에는 대량 보급단계에 까지 와있으며 쌀의 경우도 50%의 피틴산이 감소한 돌연변이체를 방사선 육종으로 확보하여 개발에 박차를 가하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서 추진하고 있는 우리 나라의 주요 곡물인 쌀에 있어서의 저 피틴산 종자의 개발이 세계적인 흐름 속에 어떠한 자리를 차지하고 있는지를 가름할 수 있다.

한편 돌연변이 처리나 유전자 조작을 통한 유용한 생물체의 선발 및 육종은 많은 연구자에 의해 진행이 되고 있다. 이때 목적으로 하는 생물체 선발의 성공 여부는 신속하고 정확한 스크리닝 방법의 확보 여부에 달려 있다고도 할 수 있다. 일반적으로 스크리닝에 있어 검사체의 수는 통상적인 분석 방법으로는 감당 할 수 없을 만큼 방대한 수이기 때문에 신속한 스크리닝 방법의 확보는 연구의 성패를 가름한다고 할만큼 중요하다고 할 수 있다. 더욱이 곡물의 성분 육종의 경우 10mg전후의 시료로 분석이 가능한 미량 분석 체계와 더불어 앞서 언급한 신속 분석 체계의 확립이 전제되어야만 스크리닝이 가능하다고 할 수 있다. 이러한 전제를 충족시키기 위하여 본 연구에서는 저 피틴산 돌연변이체 스크리닝을 위한 미량 분석법을 개발하였으며 단시간에 50,000여 개의 시료를 처리하여 LPR의 스크리닝을 가능하게 하였다. 현재까지 스크리닝 과정을 통하여 선발된 돌연변이체 중 계통의 고정화가 진행되고 있는 계통은 모두 58계통으로 M₅ seed의 경우 올해 수확량이 700kg에 달한다. 이러한 대량생산은 아직까지 미흡한 식품학적 적성을 살피는 반면 종자로서의 유지를 위한 이용가

치가 높을 것으로 기대된다. 선발된 mutant의 피틴산 함량은 HPLC, HVPE, 비색법 등 각종 방법을 통하여 확인한 결과 최대 92%의 피틴산이 감소하였으며 계대 과정중 저 피틴산의 형질이 잘 유지함을 확인하므로써 새로운 유전자원으로서 충분한 가치가 있는 것으로 판단이 되고 있다. 한편 본 연구에서 개발된 방법은 본 연구자에 의하여 옥수수나 콩과 같은 재료에 적용하여 연구를 진행하고 있다.

피틴산은 종자 생리학적인 면에서 매우 중요한 의미를 갖는 화합물이다. 그러나 피틴산 분석의 어려움 및 검출의 까다로움 등으로 식물체 내에서 피틴산의 생합성 경로는 아직도 완전히 밝혀지지 못하고 가설이 제안된 상태로 있다. 미생물을 포함한 생물체의 대사경로 연구에 있어서 대사결손 돌연변이주의 획득은 강력한 수단으로 이용된다. 현재까지 획득된 피틴산 합성대사 결손주로는 옥수수의 경우가 보고되고 있다. 저 피틴산 옥수수의 경우 피틴산의 함량이 약 70% 감소된 것이 보고되어 있을 뿐이다. 그러나 본 연구에서는 90% 이상 감소주를 포함하여 피틴산 합성능력이 다양하게 결손된 변이주를 획득하여 육성 중에 있으므로 피틴산의 생합성 과정을 연구하는데 있어 매우 중요한 자료가 될 것이다. 본 연구의 일부에서 피틴산 생합성 경로의 해명을 목표로 변이주를 이용한 피틴산의 합성을 시도하였으나 만족하지는 못하나 inositol phosphates의 합성을 확인하였으므로 생합성 경로 해명의 실마리는 제공하는 성과를 올릴 수 있었다고 판단한다. 이는 mutant를 유전적으로 고정화시키는 과정중에 있었으므로 충분한 시료의 확보가 곤란하였고 생성물의 검출 실험을 국내에서 충분히 할 수 없었던 점등 몇 가지의 한계로 인하여 심층적인 접근이 곤란하였기 때문이다. 앞으로 보다 더 구체적인 연구는 과제로 남겨야 할 것이다.

연구기간 중 많은 시료를 확보 할 수는 없어 쌀의 미질을 측정할 수는 없었으나 식품학적으로 기본적인 파라미터가 될 수 있는 종실중의 전분의 성질, 지방산의 조성, 단백질의 조성 등을 통하여 LPR mutant의 기본적인 식품학적 성질을 살펴보았다. 전분의 성질, 지방산의 조성, 단백질의 조성 등은 LPR mutant나 parent에 있어서 기본적인 차이점이나 변화는 발견할 수 없었다.

M₃ LPR mutant의 지방산 분석 결과에서는 parent에 비교하여 저급 지방산의 현저한 증가

가 관찰되었다(Table 13). 따라서 이러한 변화의 유지를 관찰하기 위하여 M₄ 및 M₅ seeds의 지방산 조성을 계속하여 분석하였으나 M₃ seeds에서 나온 결과와는 일치하지 않는 결과가 나왔다. 즉, 대조군인 parent와 LPR mutant로부터 추출된 중성지방과 극성지방의 지방산 조성은 커다란 변화를 보여주지 않고 있다. 이와 같은 결과는 M₃ seeds의 지방산을 분석한 시점이 수확 후 7개월이 지난 시점이라는 것이 크게 작용한 것으로 판단된다. 실제로 parent의 지방산 조성을 보면 Table 13과 Table 14, 15의 결과와 서로 다르게 나타나 Table 13의 경우 시료의 저장 과정중 지방산의 변화가 일어났음을 암시하고 있다. 특히 LPR의 경우 종실내의 피틴산의 함량이 현격히 낮아 무기 양이온들이 피틴상태로 킬레이트 되어있지 않고 유리 상태로 존재하므로 철과 같은 무기 양이온이 조직 내에서의 여러 가지 산화반응에 적극적으로 관여한 결과 LPR mutant에 있어서 지방산의 변화가 더욱 일어났던 것으로 판단된다. 즉, LPR mutant의 경우 시료의 저장기간이 길어지면서 피틴산과 결합하지 않은 상태로 존재하는 제일철의 산화와 더불어 지방산의 변패도 parent에 비하여 가중되어진 결과로 판단된다. 이러한 결과로부터 LPR의 저장과 식품학적 성질의 변화에 관한 보다 신중한 검토가 필요한 것으로 판단되어진다. M₄ 및 M₅ seeds의 지방산 조성을 보면 피틴산 생합성 경로의 교란이 지방산의 생합성 대사에는 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 한편 종실 내 피틴산의 존재 유무는 단백질의 추출 내지는 용출에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 전반적으로 LPR mutant와 parent사이의 단백질 조성에는 큰 변화는 발견되지 않고 있다. 단지 acid soluble fraction의 경우 LPR mutant와 parent에 있어 커다란 차이를 보여주고 있다. 즉 LPR mutant의 경우 parent보다 훨씬 많은 종류의 단백질이 추출되고 있으며 그 양상은 parent의 것과 상당한 차이를 보여주고 있다(Figure 26, 30, 34). 일반적으로 피틴산은 조직 내에서 무기물이나 단백질과 결합한 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 단백질의 추출에 미치는 피틴산의 영향을 보기 위하여 LPR mutant에 parent와 같은 수준의 피틴산(final 1.2%)을 가하고 동일한 방법으로 추출하여 acid soluble protein의 pattern을 전기영동으로 관찰한 결과 피틴산의 첨가에 의해 acid soluble protein의 추출 pattern은 LPR mutant가 parent와 같아지고 있어 단백질의 추출에

있어 피틴산이 커다란 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다. 피틴산은 종실 내에서 단백질과의 복합체를 이루어 분포한다. 또한 소화기관내에서 유리 피틴산은 소화 효소와 복합체를 형성하여 소화 효소의 활성을 저해하기도 하며, 피틴산과 복합체를 형성한 단백질은 소화 효소의 작용을 받기 힘들게 되므로 단백질의 소화 흡수에 영향을 미친다. Figure 26, 30, 34의 결과는 피틴산의 농도를 낮춤으로서 쌀 속에 존재하는 단백질의 이용효율을 높일 수 있음을 직접적으로 보여주고 있다.

현재 LPR mutant가 M₅ 세대까지 계통유지가 성공적으로 진행이 되고 있으며 M₅ seed 58 계통에 대하여 700kg의 수확량을 확보하고 있다. 또한 유전적인 고정화도 상당히 이루어진 것으로 판단이 된다. 앞으로 작물학적인 관점에서의 검증이 뒤따라야 하겠지만 현재까지의 재배상황은 parent와 거의 차이가 없는 것으로 나타나고 있다. 저 피틴산 쌀만이 갖는 식품학적 특성을 더욱 연구한다면 국제적으로 경쟁력이 있는 식량 또는 식품원료로 개발이 가능할 것으로 판단한다.

제 5 절 참고문헌

1. Jacob Lehrfeld (1994) HPLC Separation and Quantitation of Phytic Acid and Some Inositol Phosphates in Food: Problems and Solutions. J. Agric. Food Chem. 42, 2726 - 2731.
2. Philip W. Majorus, Thomas M. Connolly, Vinay S. Bansal, Rojor C. Inhorn, Theodora S. Ross, and Danial L. Lips (1988) Inositol Phosphates: Synthesis and Degradation J. Biol. Chem. 263, 3051 - 3054.
3. Victor Raboy (1990) Biochemistry and Genetics of Phytic Acid Synthesis "Inositol Metabolism in Plants", Wiley-Liss, Inc., 55 - 76.
4. Steven R. Hull and Rex Montgomery (1995) *myo*-Inositol Phosphates in Corn Steep Water. J. Agric. Food Chem. 43, 1516 - 1523.
5. Victor Raboy and David B. Dickinson (1987) The Timing and Rate of Phytic Acid Accumulation in Developing Soybean Seeds. Plant Physiol. 85, 841 - 844.
6. Victor Raboy, Stephen J. Hudson, and David B. Dickson. (1985) Reduced Phytic Acid Content Does Not Have an Adverse Effect on Germination of Soybean Seeds. Plant Physiol. 79, 323-325.
7. L. R. Stephens and R. F. Levine. (1990) Stepwise phosphorylation of *myo*-inositol leading to *myo*-inositol hexakisphosphate in Dictyostelium. Nature. 346, 580-583.
8. Edward A. Funkhouser and Frank A. Loewus. (1975) Purification of *myo*-Inositol 1-Phosphate Synthase from Rice Cell Culture by Affinity Chromatography. Plant Physiol. 56, 786-790
9. Wolfgang Haug and Hans-Joachim Lantzsch. (1983) Sensitive Method for the Rapid Determination of Phytate in Cereals and Cereal Products. Manuscript received. 1423-1426.

10. Puspa R. Saha, Connie M. Weaver, and April C. Mason. (1994) Mineral Bioavailability in Rats from Intrinsically Labeled Whole Wheat Flour of Various Phytate Levels. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2531-2535.
11. Sudesh Jood, Amon C. Kapoor, and Ram Singh. (1995) Polyphenol and Phytic Acid Contents of Cereal Grains As Affected by Insect Infestation. *J. Agric. Food Chem.* 43, 435-438.
12. Santosh Khokhar and Pushpanjali, G. Roger Fenwick. (1994) Phytate Content of Indian Foods and Intakes by Vegetarian Indians of Hisar Region, Haryana State. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2440-2444.
13. L. Beal and T. Mehta. (1985) Zinc and Phytate Distribution in Peas. Influence of Heat Treatment, Germination, pH, substrate, and Phosphorus on Pea Phytate and Phytase. *J. Food Sci.* 50, 96-100.
14. N. R. Reddy, S. K. Sathe, and M. D. Pierson. (1988) Removal of Phytate from Great Northern Beans(*Phaseolus vulgaris* L.) and Its Combined Density Fraction. *J. Food Sci.*53, 107 - 110.
15. A. D. Ologhobo and B. L. Fetuga (1984) Distribution of Phosphorus and Phytate in Some Nigerian Varieties of Legumes and Some Effects of Processing. *J. Food Sci.* 49, 199 - 201
16. J. R. Brooks and C. V. Morr (1982) Phytate Removal from Soy Protein Isolates Using Ion Exchange Processing Treatments. *J. Food Sci.* 47, 1280 - 1282.
17. So-yan Lu, H. Kim, N.A.M. Eskin, M. Latta, and S. Johnson (1987) Changes in Phytase Activity and Phytate During the Germination of Six Canola Cultivars. *J. Food Sci.* 52, 173 - 175.
18. F. M. Clydesdale and A. L. Camire (1983) Effect of pH and Heat on the Binding of Iron, Calcium, Magnesium, and Zinc and the Release of Phytic Acid in Soy Flour.

- J. Food Sci. 48, 1272 - 1274
19. Pavel Blatny, Frantisek Kvsanicka, and Ernst Kenndler (1995) Determination of Phytic Acid in Cereal Grains, Legumes, and Feeds by Capillary Isotachophoresis. J. Agric. Food Chem. 43, 129 - 133.
 20. A. W. Smith, D. R. Poyner, H. K. Hughes and P. A. Lambert (1994) Siderophore activity of *myo*-inositol hexakisphosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 176, 3455 - 3459.
 21. R. A. Wilcox, R. A. Calliss, C. Liu, B. V. Potter, and S. R. Nahorski (1993) Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate induces calcium mobilization via the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Mol. Pharmacol 44, 810 - 817.
 22. P. T. Hawkins, D. R. Poyner, T. R. Jackson, A. J. Letcher, D. A. Lander and R. F. Irvine. (1993) Inhibition of iron-catalyzed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for *myo*-inositol hexakisphosphate. Biochem. J. 294, 929-934.
 23. W. van Hartingsveldt, C. M. van Zeijl, G. M. Hartevelde, R. J. Gouka, M. E. Suykerbuyk, R. G. Luiten, P. A. van Paridon, G. C. Selten, A. E. Veenstra, R. F. van Gorcom. (1993) Cloning characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. Gene, 127, 87-94.
 24. L. Stephens, T. Radenberg. U. Thiel, G. Vogel, K. H. Khoo, A. Dell, T. R. Jackson, P. T. Hawking, and G. W. Majr. (1993) The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s). J. Biol. Chem. 268, 4009-4015.
 25. B. M. Luttrell. (1993) The Biological relevance of the binding of calcium ions by inositol phosphates. J. Biol. Chem. 268, 1521-1524.

26. Barbara F. Harland, Ph. D. and Eugene R. Morris, Ph. D. (1995) Phytate: a good or bad food component?. Nutrition Research., 15, 733-754.

제 4 장 벼 수정란의 MNU처리에 의한 phytate 저함량 계통의 선발 및 유전 분석

제 1 절 서 설

벼의 경우 재배지 및 품종에 따라 조금씩은 다르나 현미의 경우에 있어서 1~2%의 phytate 산을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다. Phytate가 우리 인체에 미치는 영향에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않으나, 여성의 경우 갱년기 이전의 철의 부족 및 갱년기 이후의 칼슘의 섭취부족으로 인하여 노년기에 접어든 여성들에게서 나타나는 골다공증· 각종 부인병등의 주요한 원인이 되고 있는 것으로 보고되고 있다. 이는 쌀을 주식으로 하는 동남아시아의 여러 국가의 경우에서 나타나는 공통적이 사항으로 그 하나의 성분이라고 생각되어 지는 phytate 산이 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다고 생각되어지며, 이와 같은 관점에서 phytate 산의 함유 함량이 낮은 벼의 품종 개발이 필요하며 이들을 식생활에 적절히 이용 함이 중요할 것으로 여겨진다.

제 2 절 재료 및 방법

1. MNU 처리 및 돌연변이 선발 조건규명

가. 공시재료

- 1) 영덕벼:미질이 양호하고 냉조풍지역에 적응성이 높아서 동남부 해안지대의 품종임.
- 2) 일품벼:쌀의 품질과 밥맛이 매우 양호하면서 내도복, 다수성 품종으로 중부평야지대 및 남부내륙 중산지대의 장려품종이다.

나. MNU처리

MNU의 처리는 크게 구별하여 공시재료의 준비->처리 전 작업->처리->등숙->저장의 5단계로 실시 하였다.

- 1) 공시재료별로 64개체씩 처리전일 포장에서 한 pot에 2개체씩 이식 시킨 다음 각 주당

분열정도에 따라 생육이 일정한 이삭을 10개정도씩 처리대상으로 정하여 나머지 이삭은 모두 제거시킨 다음 각 이삭에서 지금까지 개화한 영화는 모두 제거시키는 작업을 실시하였다. 처리당일 벼의 개화가 극대점에 달하는 11-1시를 기준으로 개화하지 않은 영화는 다시 모두 제거하였다.

2) 남겨진 이삭의 영화를 대상으로 평균개화시기가 12시로 기준 하여 개화는 수분된 시기라면 화분이 자방의 난세포와 수정되어 수정란의 세포분열이 시작된다고 여겨지는 8시간 후인 오후 8시부터 처리를 실시하였다. 처리단계는 1시간 간격으로 실시하여 15단계와 처리하지 않은 대조구를 두었다. 처리조건은 메칠니트로소우레아 (N-methyl-N-nitrosourea; MNU) 의 특성상 광에 약해서 광분해성이 강함으로 암조건에서 처리하였다. 처리농도를 1mM로 하고, pH는 4.8~5.0로 조정하고, 처리액의 온도는 평균 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 하여, 45분간 준비된 이삭을 침지시키는 방법으로 처리한후 24시간 동안 흐르는 물에서 수세를 실시하였다.

3) 수세가 끝난 식물체는 초자실로 옮겨서 30일정도 강원대학교 농장의 재배 관행법에 의한 재배를 통하여 등숙시켰다. 등숙된 종자(M_0 seed)는 각 처리 단계별로 수확하여 4°C 에서 냉온 저장하며 각종실험에 사용하였다.

2. 돌연변이체의 선발

돌연변이 계통을 선발하기 위해서는 다음과 같은 절차에 의해서 실시하였다.

가. 돌연변이원을 처리한 영덕벼(KM)와 일품벼(CM)는 각 처리구별로 처리 후 1개월간 강원대학교 부속농장의 초자실에서 재배·생육시켜서 완숙종자를 얻었다. 이를 육종관리의 편의상 M_0 종자로 명명하였으며, 원숙된 종자는 냉동고에 저장하였다. 보통의 경우 벼씨는 실온에서 2~3년이 경과하면 그 발아력이 20~30%의 수준에도 미치지 못하기 때문에 냉동고에서의 저장은 중요하며, 이들의 종자의 특성이 어떠한지도 알수 없는 상황이므로 더욱 냉온저장의 필요성이 검토 되었다.

나. 이들 M_0 종자를 다음해에 각 처리구당 생성된 전체의 종자를 파종에 준비하여 4월 중순에 기계이앙 못자리 상자에 파종하여 재배하여 건실한 모를 육묘하였다(M_1 식물체). 육묘기간 및 육묘방법은 강원대학교 부속농장의 관행법을 따랐으며 통상 35~40일간 육묘하고 저온

에 대비하여 비닐보온절충못자리의 관리 체계에 따랐다.

다. 건묘로 자란 각 처리구의 모는 강원대학교 부속농장의 포장에 30 x 30cm의 간격으로 1주1모의 이앙에 따른 손이앙으로 못내기를 실시하였다.

라. 이앙 후 재배 및 생육조건은 강원대학교 부속농장의 관행법에 따라 재배하였다.

마. 벼의 일생상에 영양생장기와 생식생장기를 거치는 동안 각종 돌연변이를 동정하였다. 그 예로는 영양생장기에서 생식생장기로 전환되는 시기에 생육조사를 통하여 초장의 이상을 보이는 경우·엽의 엽록소 형상에 이상을 보이는 경우·초형에 이상을 보이는 경우 등에 따른 각종 돌연변이와 생식생장기 동안에는 화기형성에 이상을 보이는 경우·출수기의 이상을 보이는 경우 등으로 연구자의 연구 목적에 따라 다양한 screening 방법으로 각종 돌연변이를 동정할 수 있었다.

바. M_0 종자에 의해 재배된 M_1 식물체는 8월 중·하순부터 개화하여 9월 중·하순경에 결실을 얻을 수 있었으며 이들 종자는 M_1 종자로 명명하고 각 처리구에서 재배된 M_1 식물체로부터 M_1 종자를 얻었는데, 이들의 수량이 너무나 많은 관개로 각 주당 5개씩의 이삭을 채취하였다. 채취 방법으로는 나비 5cm에 길이 40cm의 종이에 천공을 20개씩 만들어서 하나의 천공에 각 처리구에서 재배된 M_1 식물체로부터 생성된 M_1 종자가 달려 있는 이삭을 5개씩 넣는 방법을 실시하여 다음에 계통으로서의 구별이 가능하도록 하였다.

사. 얻어진 M_1 종자는 수분이 15%정도 되도록 건조시킨 다음 저온실에 보관하며 각종 연구에 이용될 재료로 준비되었다.

아. 이와 같은 M_1 종자는 아직 그 유전적 분리의 정도에 변이가 다양함으로 돌연변이의 선발에 이용되지 못하는 관계로 다시 한번 가~사의 과정을 거쳐서 M_2 식물체와 M_2 종자를 얻어서 이 M_2 종자를 대상으로 각종 연구 목적의 재료로 이용하였다. 이들 M_2 의 종자는 다양한 돌연변이를 가지고 있는데, 그 예를들어 보면 벼의 배발생에 이상을 보이는 돌연변이와 본 실험에서 사용된 저 phytate산 돌연변이의 동정에도 이용되었다. 배발생에 이상을 보이는 돌연변이의 동정에는 M_2 ~ M_3 종자의 발아상태를 조사하고 발아에 이상을 보이는 개체를 표본으로 하여 로타리마이크로톰으로 절편을 제작하여 배의 형성에 이상의 유·무를 조사하여 돌

연변이를 동정하였다. 저 phytate산 돌연변이의 경우는 각 처리구에서 얻어진 M₂종자에서 5개의 이삭 중 1개에서 약 100립의 종자에서 phytate산의 함유량에 따라 발색의 정도가 구별되는 산분해 비색법으로 돌연변이체를 선발하였다.

자. 저 phytate산 함유 돌연변이를 선발함에 있어서 난점은 선발에 사용된 개체의 배유부분만을 반응실험에 사용하고, 나머지 배을 포함한 반은 다음 세대의 진전을 위하여 남겨야 하는 점이었다.

차. 저 phytate산 함유 돌연변이의 선발은 우선 phytate산이 배유의 호분층에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있으므로 벼 종자의 형태적 특성상 호분층은 배를 포함하는 종피에는 없으므로 배유부분만을 종자로부터 분리하여 산분해 비색법 발색반응실험에 이용하였다. Phytate산 함유의 정도는 그 함유의 정도에 따라 반응이 없으며, 저함유의 경우일수록 반응의 정도가 강하여 진한 보라색을 보인다. 이와 같은 발색반응의 정도에 따라서 다음과 같이 구분하였다. M₂종자에서 50% 저함유 phytate산 돌연변이 · 70% 저함유 phytate산 돌연변이 · 90% 저함유 phytate산 돌연변이 등으로 분류 하였다.

카. 산분해 비색법의 발색 반응에 의하여 선발된 돌연변이체의 배을 포함한 반은 초기 발아와 영양생장기 초기의 영양분을 공급할 영양분이 없는 관계로 이 반쪽 부분을 조직배양의 방법으로 정상적인 식물체(M₃식물체)로 분화시켰다. 조직배양의 경우는 우선 배부분을 포함한 각 돌연변이체를 2%의 sodium hypochlorite 용액에 30분간 소독하고 2~3회 증류수로 세척한 후에 치상하였다. 치상에 이용된 배지는 호르몬이 첨가되지 않은 MS(Murashige and Skoog) 기본 배지에 2% saccharose와 0.8% agar를 첨가한 것을 사용하였다. 조직배양의 조건은 25°C 광조건에서 2주간 생육시켰으며, 본엽이 4~5매 출현한 식물체를 순화용 이양상자로 이식하여 본엽이 6~7매 출현한 것을 정식으로 이양하여 정상적인 식물체(M₃ 식물체)로 분화시켰다.

파. 이들 M₃식물체로부터 M₃종자를 얻었으며 이들은 유전적으로 조금은 불안정하나 거의 고정된 단계로 들어섰다고 여겨진다. 이들의 각 계통은 다량의 종자를 확보하여 다른 세부과제의 연구의 자료로 공급하며, 세대의 진전을 시킴과 동시에 각 계통의 생육조사와 각 계통

간의 대립유전자의 가능성등을 연구하기 위하여 중요한 자료로 이용되고 있다.

3. 돌연변이체들의 재배 및 농업형질 조사

본 연구에서는 돌연변이체의 재배와 농업형질의 조사에 관한 부분으로 그 첫번째로 재배의 경우는 다음과 같이 5가지로 구분하여 실시하였다.

가. 본포장에서의 재배

본포장은 강원도 춘천시 천전리에 있는 강원대학교 부속농장의 답작포장에서 실시하였다. 벼의 수정란에 MNU를 처리하여 얻어진 M_0 종자(영덕벼 8,619개, 일품벼 11,331개)을 4월중순경에 기계이앙모판에 파종하여 30~40일간 재배하여 건전한 육묘로 생육시킨 다음 5월하순경에 본답에 정식으로 1주1모로 손이앙 하였다. 재 배는 각 처리구당 일정한 면적으로 구분하였다. 그 구획은 실험구 배치에 따른 것으로 모간 재식거리는 30 x 30cm로 하여 처리구의 넓이는 10주를 기본으로 하였다. 처리구간 재식거리는 1m의 간격을 두어 처리구간의 혼잡이 없도록 하였다. 각종 생육의 조사를 위하여 처리구의 넓이간에는 1m의 거리를 두어 조사자의 이동과 재료의 채취 및 넓이간의 혼잡이 없도록 하였다. 재배·생육상의 관리는 강원대학교 부속농장의 관행법으로 실시하였다. 생육 기간중에 엽록소의 결핍등에 의하여 생성되는 돌연변이체의 선발과 출수기에 관련된 돌연변이체, 왜성(키가 작아지는 현상)의 돌연변이체, 꽃(화기)이 이상을 보이는 돌연변이체 등을 선발하도록 하였다. 수확은 9월 하순경 완숙기에 접어든 M_1 식물체로부터 M_1 종자를 얻었는데, 이들의 수량이 너무나 많은 관계로 각 주당 5개씩의 이삭을 채취하였다. 채취 방법으로는 나비 5cm에 길이 40cm의 종이에 천공을 20개씩 만들어서 하나의 천공에 각 처리구에서 재배된 M_1 식물체로부터 생성된 M_1 종자가 달려 있는 이삭을 5개씩 넣는 방법을 실시하여 다음에 계통으로서의 구별이 가능하도록 하였다.

전체 재배면적은 600평 정도로 용수의 관개는 부속농장의 온수지를 이용하여 재배상에 관개에는 문제점이 없었으며, M_2 식물체에서 M_2 종자를 얻는 재배에서도 위와 같은 재배의 양식을 따랐다. 재배상에서 일반재배와 다른 점은 돌연변이체의 성숙의 숙기에서 차이를 보이는 돌연변이체들이 있는 관계로 방조망을 설치하여 재배하였다는 점이다. 또한 일반재배에서도 문제점이 되듯이 설치류(쥐)의 피해에 줄이기 위하여 쥐약을 논두렁에 20m의 간격으로 설치

하여 수확에 손실이 없도록 재배하였다.

나. 소단위 하우스형 재배

소단위 하우스형 재배는 M₁과 M₂의 종자에서 돌연변이체로 선발된 개체를 대상으로 재배하는 양식으로 강원도 춘천시 효자동에 위치하는 강원대학교 부속농장의 소단위 하우스 포장으로 그 규격이 넓이 4.5m로 하고 길이 30m의 하우스형 포장을 2개소 사용하여 재배하였다. 이 하우스의 형태는 지상에 2m높이로 철재 골조물이 설치되어 있어서 재배상에 필요로 하는 각종 기구를 설치하여 이용할 수 있는 조건이다. 포장의 중앙에는 일자로 통로가 설치되어 있어서 농기구의 이출입이 가능하고 각종 조사에도 편리한 시설이다.

일장과 일조의 상태는 자연의 상태에서 재배된다는 점에서 본답의 포장과 동등한 조건으로 볼 수 있다는 장점이 있다. 반면, 관개에 있어서는 자연강우에 의한 관개가 일부 있기는 하지만 기본적으로 본답과 같이 수분을 함유할 수 없는 관계로 누수가 많아서 관개를 수돗물에 의존해야 한다는 단점을 가지고 있다. 이와 같은 단점은 반면에 벼의 재배·생리 특성상 중간낙수와 일반낙수를 할 필요성이 있는데, 이와 같은 경우에는 유리한 점으로 작용하기도 하였다.

소단위 하우스에서는 4월 중순의 못자리를 비닐보온 터널식 못자리를 만들어 육묘한 후 관수를 하여 씨레질을 하고 이앙을 준비하였다. 각종 식물체의 재식거리는 넓이 2m에 길이 30m의 포장에 넓이 20 x 30cm로 하여 1주1모의 방식으로 손이앙하였으며, 전년도에 주로 보존된 각종 돌연변이체는 분지하여 각각을 앞에서 설명한 재식거리에 준하여 이앙하였다. 생육기간중 식물체의 관리 및 각종 자료의 채취에는 작은면적에서 재배됨으로 실험자의 관찰이 용이하여 편리하였다. 특히 이와 같은 소단위 하우스에서의 재배는 실질적으로 벼의 수정란에 MNU를 처리할 자료를 채취하여 pot에 이식하는 과정에도 본답의 식물체를 이식하는 경우와 비교하여 매우 유리한 재배양식으로 이용되었다.

생육후반기에 조류의 피해를 줄이기 위해서 방조망을 설치하는데 있어서도 철재 골조물의 지지대가 있으므로 설치에 용이하였으며, 골조물의 사면에 전체적으로 철제로 된 망이 설치되어 있으므로 설치류(쥐)의 피해는 자동적으로 방제되었다고 볼 수 있었다.

다. Pot에서의 재배

Pot를 이용한 재배는 통상 소단위로 직접적인 자료를 채취할 필요성이 있거나 소유하고 있는 종자나 식물체의 수가 적은 경우 사용되는 경우이다. 재배에 사용되는 pot는 크게 두가지로 지름이 25cm 높이 27cm정도의 갈색의 pot와 와그너 pot로 불리는 흰색에 지름이 22cm에 높이 29cm의 pot가 주로 이용되나 pot 재배에 주로 이용되는 경우는 전자로 관리에 편리하고 신축성이 있는 관개로 파손의 위험이 적기때문이다. 하지만 단점으로 여름철에 지온 및 기온의 상승과 더불어 pot내의 온도가 와그너 pot와 비교하여 높다는 점이있다. 하지만 벼의 경우 수분의 공급만 충분 하다면 수온의 상승은 그다지 문제가 되지 않으므로 갈색의 이 pot가 주로 이용되고 있다. 와그너 pot는 쉽게 파손 된다는 단점이 있기는 하지만 정교한 재배 및 생리를 위주로 하는 실험에는 주로 사용되는 pot이다. 하지만 가격면에서 비경제적이라는 점에서 많이 사용하지는 않았다. 기타의 pot로는 플라스틱의 바켓스를 pot의 대용으로 사용하기도 한다. 이것은 다른 pot들 보다 가격적인 면에서 유리하고 이동에 있어서 손잡이가 있다는 유리한 점이 있어서 많이 이용되고 있다.

Pot 재배에 있어서 기존의 분담재배와 하우스형 재배와 다른 차이점은 pot에 담아 재배에 이용할 토양의 준비와 비료분의 비배의 관리 및 수분의 관개에 어려운 점이 있다. 토양의 준비는 기본적으로 점질토(황토)를 준비하고 기존의 분담의 논토양을 구해다가 50:50%의 비율로 섞어서 사용한다. 이때 이물질이 pot내에 함유되는 것을 방지하고 토양의 공극을 극대화하기 위하여 5 x 5mm 정도의 채로 흙을 쳐서 사용한다. Pot에는 높이 25cm 정도가 될 때까지 흙을 담아서 복합비료(N·P·K)를 50g 정도 넣은후 수분을 보충하여 재배에 이용한다. 흙을 담아 놓은 pot에 수분의 공급은 재배대상을 이양하기 직전에 공급하여야 한다. 이는 토양이 수분과의 혼합후 수분이 증발에 의하여 극단의 축소화를 막기위한 것으로 주의 하여야 한다. Pot 재배에 있어서 중요한 점은 관개로 pot는 부충되는 수분이외의 수분을 주위로부터 공급 받을 수 없기 때문에 관개의 부족은 생육 및 성장뿐만아니라 수분부족의 생리적장해를 가져 오게 된다. 특히 한 여름의 관개는 경우에 따라 24시간 동안에 2~3회를 실시해야 하는 어려움도 있다. 이와 같은 관개의 편리성을 도모하기 위하여 고안된 방법은 수조를 만들어 계속

적인 수분을 공급하고, pot의 밑부분에 구멍을 만들고 이곳을 통하여 pot내에서 생육중인 벼가 수분을 지속적으로 공급받도록 하여 재배에 이용하기도 한다. Pot에서의 재배는 기본적으로 1주1모의 재배가 용이하고 재식거리의 면에서도 임의로 pot간의 거리를 조정함으로써 가능하기 때문에 편리하고, 조류나 설치류의 피해에 대비하기에도 이동성이 용이하기 때문에 실험의 목적상 유용한 방법으로 이용되고 있다.

라. 월동기간의 재배

월동의 재배는 본 실험에서는 기본적으로 강원도 춘천시 효자동의 강원대학교 부속농장의 초자실을 이용하여 실시하였다. 초자실은 오일을 이용하여 온도를 조절하는 방식으로 온도의 조절을 조절판에 의하여 자동적으로 조절됨으로 이용의 편의성이 유리하다.

겨울철의 월동기간의 보존용 식물체의 재배는 일반적으로 pot재배를 이용한다. 이때에는 pot의 밑에 있는 구멍을 모두 열어서 수분의 공급이 불포화 상태가 되도록 하여야 한다. 월동기간 중의 재배는 생육을 통한 수확이 목적이 아니고 생육상의 재배조건도 불리하여 타당한 결과를 얻기가 어렵다. 때문에 식물체가 생명을 그대로 유지되어 생존한다는 것만으로도 큰 성과를 얻은 것으로 평가할 수 있다. 기본적으로 10월경에 본답 또는 소단위 하우스 및 pot에서 재배되던 식물체를 알맞은 크기로 분지하여 월동용으로 pot에 이식하게 된다. 이때의 식물체의 상태는 상당부분의 뿌리와 엽의 잘려진 상태로 전반적인 생육상이 위축되어 있는 조건이다. 때문에 새로운 pot에 이식을 하면 활착력이 빠르고 잘려진 엽에서 새로운 엽의 출현과 분얼이 왕성하다. 또한 겨울철의 주야간의 변온의 정도가 심하며, 일장량과 일사량이 제한적으로 줄어들기 때문에 절기상의 가을과 같은 상태이므로 일부의 이식의 출수가 촉진된다. 이와 같은 불규칙적인 이식의 출수는 벼의 보존에 불리한 쪽으로 영향을 미치게 됨으로 가능한한 빠른 시간내에 제거하도록 하는 것이 보존하는 식물체의 정상적인 생육에 도움을 준다. 수분의 공급은 극히 제한적으로 실시하여 부패의 위험을 막아야 한다. 부패는 초자실인 관계로 다습이 문제로 대두되고, 겨울철이라 보온의 관계상 환기의 조건이 불리하여 자주 발생할 수 있는 문제이다.

마. 기타의 재배양식

기타의 재배로는 pot에 따른 토양의 준비와 재식의 제한에 따른 문제점을 보완하기 위하여 파종상자에 재배하는 방식이 있다. 파종상자는 크기가 높이 15cm, 넓이 40cm, 길이 60cm 정도로 재배는 통상 15~20주까지 가능하다. 단점으로는 하나의 파종상자의 이동에 있어서 들어있는 토양과 수분의 무게를 합하여 무겁기 때문에 불편함이 있다. 때문에 이와 같은 재배는 겨울철 월동의 재배에서 많이 이용되나 수분의 관리에 있어서는 약간의 문제점이 있다고 할 수 있다.

특수한 재배양식으로 육종의 목적을 달성하기 위하여 각종 돌연변이체의 출수기를 조정하여 출수의 시기를 동일하게 하는 암막을 이용한 광조건을 조절하는 재배를 실시하였다. 이 암막을 이용한 재배는 주간 8시간 야간 16시간으로 하루 24시간의 광조건을 조절하면 일조와 일장의 양효과와 기온은 벼의 생육에 유리한 여름철의 기온이 자동적으로 제공됨으로 좋은 효과를 거둘 수 있다.

두 번째로 농업형질에 대한 조사는 조사항목을 동일한 일자의 파종일과 이앙일을 두고 각 돌연변이체들에 대하여 다음과 같은 항목에 대하여 조사를 실시하였다. ㉠출수시 ㉡출수기 ㉢수전기 ㉣성숙기 ㉤초장 ㉥간장 ㉦수장 ㉧분얼경수 ㉨수수 등의 9가지의 항목에 대한 농업형질을 조사하였다.

4. Phytate 저함량 계통선발 및 유전분석

저 phytate산 함유의 돌연변이체의 선발은 1차년도에도 자세히 설명한 바 있지만, 2년차의 경우는 다음과 같은 6 단계로 구분하여 재배하며 돌연변이체를 선발하였다.

가. 전 연도에 재배와 선발을 통하여 얻어진 M₁ 종자는 수분이 20%정도 되도록 건조시켜 저온실에 보관되었던 것을 재료로 준비하여 4월 하순경에 파종하였다.

나. 파종 후 재배 생육된 M₂식물체와 M₂종자를 얻었으며, 이 M₂종자를 대상으로 각종 연구 목적의 재료로 이용하였다. 이들 M₂의 종자는 다양한 돌연변이체를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 저 phytate산 돌연변이의 경우는 각 처리구에서 얻어진 M₂종자에서 5개의 이삭 중 1개에서 약 100립의 종자에서 phytate산의 함유량에 따라 발색의 정도가 구별되는 산분해 비색법으로 돌연변이체를 선발하였다.

다. 저 phytate산 함유 돌연변이를 선발함에 있어서 난점은 선발에 사용된 개체의 배유부분만을 반응실험에 사용하고, 나머지 배를 포함한 반은 다음 세대의 진전을 위하여 남겨야 하는 점이였다.

라. 저 phytate산 함유 돌연변이의 선발은 우선 phytate산이 배유의 호분층에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있으므로 벼 종자의 형태적 특성상 호분층은 배를 포함하는 종피에는 없으므로 배유부분만을 종자로부터 분리하여 산분해 비색법 발색반응실험에 이용하였다. Phytate산 함유의 정도는 그 함유의 정도에 따라 반응이 없으며, 저함유의 경우일수록 반응의 정도가 강하여 진한 보라색을 보인다. 이와 같은 발색반응의 정도에 따라서 다음과 같이 구분하였다. M₂종자에서 50% 저함유 phytate산 돌연변이 · 70% 저함유 phytate산 돌연변이 · 90% 저함유 phytate산 돌연변이 등으로 분류 하였다.

마. 산분해 비색법의 발색 반응에 의하여 선발된 돌연변이체의 배를 포함한 반은 초기 발아와 영양생장기 초기의 영양분을 공급할 영양분이 없는 관계로 이 반쪽 부분을 조직배양의 방법으로 정상적인 식물체(M₃식물체)로 분화시켰다.

조직배양의 경우는 우선 배부분을 포함한 각 돌연변이체를 2%의 sodium hypochlorite 용액에 30분간 소독하고 2~3회 증류수로 세척한 후에 치상하였다. 치상에 이용된 배지는 호르몬이 첨가되지 않은 MS(Murashige and Skoog) 기본 배지에 2% saccharose와 0.8% agar를 첨가한 것을 사용하였다. 조직배양의 조건은 25℃ 광조건에서 2주간 생육시켰으며, 본엽이 4~5매 출현한 식물체를 순화용 이양상자로 이식하여 본엽이 6~7매 출현한 것을 정식으로 이양하여 정상적인 식물체(M₃ 식물체)로 분화시켰다.

바. 이들 M₃식물체로부터 M₃종자를 얻었으며 이들은 유전적으로 조금은 불안정하나 거의 고정된 단계로 들어섰다고 여겨진다. 이들의 각 계통은 다량의 종자를 확보하여 다른 세부과제의 연구의 자료로 공급하며, 세대의 진전을 시킴과 동시에 각 계통의 생육조사와 각 계통간의 대립유전자의 가능성등을 연구하기 위하여 중요한 자료로 이용되고 있다.

5. 저 phytate 계통선발

본 실험에서 사용된 종자들은 저 phytate산 함유 돌연변이체를 실질적으로 선발하기 위하

여 M₂ 및 M₃의 종자에 대하여 이미 설명한 바 있는 산분해 비색법의 발색반응의 정도를 이용하여 선발하였다.

이렇게 선발된 돌연변이체는 이것도 이미 설명한 바 있듯이 조직배양용 배지를 이용하여 재배한 후 순화과정을 거쳐서 pot 및 소단위 하우스에 이양하고 이들의 생육에 따른 결과인 수확물을 각 계통별로 유지·보관하였다.

실질적으로 영덕벼에서 유기된 돌연변이체의 경우는 종자의 양적 확보와 생육이 지연되는 등의 장애로 인하여 유지의 차원에서만 재배를 실시하였고, 주로 사용된 것은 일품벼에서 유기된 돌연변이체를 이용하였다. M₂ 세대의 종자를 과중함에 있어서 그 계통이 35개인 관계로 비교적 조사의 양이 작아서 10개씩의 종자를 사용하여 돌연변이체의 계통을 비교 선발할 수가 있었다. 하지만, 그 후대인 M₃세대의 종자는 각 계통당 5개씩의 종자만을 이용하여 발색반응의 결과를 얻도록 하였다.

6. 돌연변이 계통간의 교배

저 phytate산 함유 돌연변이로 선발된 돌연변이체들은 그들이 과연 유전적으로 어떠한 연관성을 가지고 있는가가 알려지지 않으면 앞으로의 육종학적·유전학적으로 실험의 진전에 어려움이 있다. 때문에 영덕벼와 일품벼에서 얻어진 37개의 돌연변이 계통에 대하여 품종에 따른 계통간의 교배조합을 구상 교배를 실시하였다. 그 방법을 단계별로 구분하여 보면 다음과 같다.

가. 교배조합의 작성

교배조합의 경우는 실질적으로 한 여름의 일정시기(8월 중순~9월 중순; 출수·개화시기)에 국한된 것으로 실시에 어려움이 있으며, 특히 개화한 이삭은 이동이 불가능하여 교배장소의 제한성과 가능한 다수의 교배조합을 실시하여야 그 결과에 따른 돌연변이 계통간의 친화성과 어느 특징의 유전자 조합을 알고 이것을 분자생물학적인 측면에서 분석할 수 있을 것으로 기대된다. 때문에 각 교배조합에 대한 돌연변이체들을 단계적으로 암막에서 재배시켜 출수시기를 조절하여 필요한 교배조합을 얻고자 하였다.

나. 제웅 및 수분도구

교배의 효율성을 기하기 위해서는 수술을 제거하는데 많은 노동력과 시간이 걸리는 것을 해결하고자 진공펌프에 많은 플라스틱 호수를 연결하여 적당한 흡입기압을 조절하여 수술을 제거하는 방법과 수운을 이용하여 수술을 교배당일의 아침에 그 기능을 상실하게 하는 작업도 실시하여 교배의 효율성 증진에 노력 하였다. 또한 교배의 적당한 환경을 충족시키기 위하여 오전 10~11시경에 교배모본과 부분이 위치한 교배장소에 과습한 조건을 부여하고 수술의 생명력을 연장시키기 위하여 차광막을 설치하는 등의 어려움도 수반되었다.

제웅 및 수분 도구로는 교배대장과 예리하고 작동하기 쉬운 소형가위, 납작하고 끝의 폭이 1mm 정도인 핀셋, 목적 화분외의 수분을 방지하고 교배정보를 기록하기 위한 5 x 20cm 크기의 유산지 봉투, 유산지용 연필(유성 name pen), 칩핀, 의자, 수건 등과 진공펌프를 이용한 제웅기를 사용할 때 꽃밥의 크기에 따라 교환할 수 있게끔 유리관끝 구멍의 크기가 다양한 흡출기(대용으로 분자실험용 마이크로 피펫의 tip)를 준비하고 교배도구함에 넣어 항상 일정한 장소에 보관하며 이용하였다.

제웅방법은 보통 절영법으로 꽃밥 또는 주두가 잘리지 않도록 영의 중상단부분을 가위로 잘라내고 내외영의 접합부분을 손가락으로 약간 누른 상태에서 핀셋으로 내외영의 모서리 양쪽에 있는 각각 3개씩의 꽃밥을 화사채로 끊어 올려 제거하면 된다. 이때 꽃밥을 건드리면 자식시킬 염려가 있고 암술에 상처를 주면 수정율이 떨어짐으로 조심해야 한다.

한 이삭을 완전히 제웅한 후에는 모든 꽃밥이 제거되었는가를 전체적으로 확인하고 봉투의 좌상단에 모본의 품종명 또는 출처번호, 계통명등을 기재하고 좌하단에 제웅날짜와 제웅한 사람의 이름을 기록하고 봉투의 내부에 물을 포함한 스프레이를 이용하여 수분을 공급한 후 봉투를 씌워 목적화분의 수분을 방지한다.

다. 수분(교배)

수분방법은 부분이 막 개화했거나 개화 직전의 수술을 핀셋으로 하나씩 꺾어서 절영한 부분에 대고 살짝 누르면 화분막이 터지면서 화분립이 쏟아져 주두에 수분된다. 수분이 끝나면 봉투에 부분의 명칭을 기록하고 제웅에서 동일하게 수분을 공급 후 봉투를 씌운다. 수분 후 보통 3~4일이면 교배종자의 발육상태를 볼 수 있는데 가능한 조기에 수정 여부를 확인하여

수정이 되지 않았으면 다시 제웅하여 수분시켜야 목적하는 교배조합을 얻을 수 있다.

7. 돌연변이체의 재배 및 평가

돌연변이체의 재배는 1차년도와 재배양식과 큰 차이가 없으며, 유전자원으로써의 평가는 이용목적에 따라서 크게 다르지만 다음과 같은 생육단계별 특성을 조사할 필요가 있다. 본 실험에서 각 단계별 특성을 일부 종합하여 생육조사를 실시한 바 있다.(표 7)

가. 1차 특성: 품종, 계통 등의 식별에 필요한 특성(크기, 가지수, 색, 굵기, 초형, 모양, 밀도, 개화기, 성숙기 등)

나. 2차 특성: 유전자원으로서 중요한 내병충성, 장애저항성, 모본특성 등(각종 병·충해 저항성, 내건, 내습, 내냉, 내한, 내도복, 수발아성, 내산성 등)

다. 3차 특성: 생산력이나 품질특성에 대한 특성(수량성, 천립중, 품질, 식미 ...)

8. 저 phytate 계통의 유지 및 증식

본 실험에서는 지금까지 저 phytate 함유 돌연변이체로 선발된 영덕벼와 일품벼의 각 돌연변이 계통을 유지 및 증식시키는데 있어서 더욱 효과적인 방법을 찾고자 노력하였다. 저 phytate 함유 돌연변이체의 경우는 옥수수에서 이미 보고된 바와 같이 동일한 양상으로 본 돌연변이체에서도 발아에 어려움이 있다. 때문에 저 phytate 계통의 유지와 증식의 방법으로 선택한 것은 유지는 현재 선발된 영덕벼의 2계통과 일품벼의 35계통을 모두 10~40개씩의 종자를 hormone free의 MS배지에 파종하여 순화시켜 강원대학교 부속농장의 하우스 포장에 이식한 후 재배하여 생육시켜 각 생육조사 및 수확 및 주를 보존하는데 이용하고자 하였다. 증식은 일품벼의 35계통중 8개의 계통은 발아의 정도가 양호함을 보임으로 이들 계통에 M3세대 58계통을 대량증식에 사용하였다. 이들 일품벼의 58계통은 강원대학교 부속농장의 관행법에 의하여 못자리를 만들고 재배·생육시켜서 강원대학교 부속농장의 본답 포장 1,000여평에 1주1모로 손이양하여 재배하였다.

9. 돌연변이 계통들의 유전분석

가. 돌연변이체들의 재배 및 농업형질 조사

돌연변이체의 농업적 형질의 조사는 기본적으로 생육조사에 준하여 실시하며 그 기초적

자료와 함께 돌연변이가 가지는 특성을 첨가하는 것으로 본 실험에서 이용된 농업적형질의 조사는 파종일·이앙일·출수시·출수기·수전기·성숙기·초장·간장·수장·분얼 경수·수수 등을 조사하였다. 이들 농업적 형질은 기본적으로 선발된 돌연변이가 저 phytate산 함유의 돌연변이를 선발한 것으로 처리대상 품종의 범위를 크게 벗어나지 않을 것으로 기대 되었다.

농업형질에 대한 조사는 조사항목을 동일한 일자의 파종일과 이앙일을 두고 각 돌연변이 체들에 대하여 다음과 같은 항목에 대하여 조사를 실시하였다. 1)출수시 2)출수기 3)수전기 4)성숙기 5)초장 6)간장 7)수장 8)분얼경수 9)수수 등의 9가지의 항목에 대한 농업형질을 조사하였다.

그 내용을 기술하여 보면 다음과 같다.

- 1) 파종일: 종자를 침종하여 최아된 종자를 이제이앙모판에 파종한 일자
- 2) 이앙일: 파종된 종자가 건묘로 생육하여 본엽이 5~7매 출엽하여 이앙한 일자
- 3) 출수시: 처음으로 이삭이 출수한 일자
- 4) 출수기: 총경수의 40%가 출수한 일자
- 5) 수전기: 총경수의 80%가 출수한 일자
- 6) 성숙기: 대부분의 이삭이 황화한 일자
- 7) 초장: 지면에서 최장엽의 선단까지의 길이
- 8) 간장: 지면에서 이삭목까지의 길이
- 9) 수장: 이삭목에서 수선까지의 길이; 망은 제외
- 10) 분얼경수: 경의 총수; 엽이 2엽이상 전개한 것
- 11) 수수: 출수된 이삭의 총수

10. 저 phytate 계통의 증식

일품벼 저 phytate산 함유 돌연변이체중 월동에 성공하고 종자를 확보한 35개의 계통에 대하여 1차적으로 각 계통당 저 phytate산 함유를 보이는 M₂종자(표 18)를 10개씩 채취하여 이들에 대하여 산분해 비산법으로 발색반응 실험을 실시하여 돌연변이체에 대한 선발을 실시

하였다.

이렇게 선발된 각 계통의 개체는 1차년도 재배양식에서와 같이 배지에서 재배한 후 순화과정을 거쳐 소단위 하우스에 이식한 후, 이들 개체로부터 다시금 M₃종자를 생산하였다. M₂종자 350개에 대하여 발색반응의 결과는 P1=CM13-8-12-14의 경우는 대부분 이 정상으로 회복된 결과를 보였고, 각각의 돌연변이 개체를 순화하여 이식하는 과정에 일부 계통의 경우는 본답 생육적응에 실패하여 치사하였다.

결국 얻어진 돌연변이체는 296개체이며, 이들 또한 생육중에 적응력 부족으로 8개체가 치사하여 결국 288개의 돌연변이체에 대하여 M₃ 종자의 수확이 이루어졌다. M₃종자들에 대한 저 phytate산 함유의 결과도 각 개체에서 얻어진 종자를 5개씩 자 료로 채취하여 앞에서와 같은 방법으로 결과를 얻는 과정의 반복하여 저 phytate산 함유 돌연변이체를 선발·유지 할 수가 있었다.(표 11)

일품벼에서 유기된 돌연변이체 M₂세대의 35계통에서 종자 350개를 이용하여 발색반응의 결과 1개의 계통 P1=CM13-8-12-14의 경우는 대부분이 정상으로 회복된 결과를 보였으며, 이들의 경우는 최초 선발에서는 저 phytate산을 함유하는 것으로 나타났으나 세대가 진전됨에 따라 원래의 정상으로 회복함에 따라 아직 유전적으로 고정이 되지않았음으로 사료된다. 이와 같은 계통은 각 계통간의 교배에 의한 유전력의 검정에서도 그 결과가 동일함을보여 정상과의 backcross 결과등과 함께 육종상 유전자의 확인에 도움을 주었다고 평가된다.

M₃세대 288개체의 종자를 5개씩을 이용하여 M₂에서와 같은 발색반응의 실험에서도 똑 같은 양상으로 결과가 나타났다. M₂세대에서 phytate산의 함유량에 변화가 없이 정상의 수치로 회복하는 1개의 계통 P1=CM13-8-12-14는 45개의 종자중 14개의 종자에서만 phytate산의 함유량이 떨어짐을 보였다. 반면에 나머지 계통에서는 고정의 효과인지는 아직 확실치 않으나 모두 떨어짐을 보였다.

저 phytate 계통의 증식은 현재 표 11에서 나타난 것과 같이 288개의 계통을 전부 파종하여 못자리에서 재배 중에 있으며, 5월하순 ~ 6월 초순에 강원대학교 농업생명과학대학 부속 농장에 이앙을 준비하고 있다. 증식에 문제점으로는 이미 옥수수에서도 알려진 바와 같이 극

히 낮은 저 phytate 산을 형성하는 계통의 경우 종자의 발아상에 문제가 많은데 본 실험의 결과에서도 총 288개의 계통중 52계통의 제외한 236개의 계통이 이와 같은 극히 낮은 phytate 산을 형성하는 것으로 발아에 이상을 보이고 있다. 때문에 본 실험에서의 증식은 우선 이들 극히 낮은 phytate 산을 형성하여 발아하지 못하는 계통에 대하여 일차적으로 35계통을 선발하여 배유를 제거하고 배지에서 발아시키고 재배하여 순화과정을 거쳐 직접적으로 본답에 이식하여 증식을 시키고자 현재 배지에 배양하여 발아시킨 후 본엽이 5 ~ 6엽 정도 출아한 것을 1일간 순화시킨 다음 소단위 하우스포장에서 재배를 실시하였다.

제 3 절 결 과

1. MNU 처리 및 돌연변이 선발 조건규명

벼의 수정란에 MNU를 처리하여 고·저 아밀로스 쌀, 고단백, 당질, 분질, 거대배, 소배 등 여러 가지로 많은 부분에 이상을 보이는 돌연변이체가 유도된다는 보고가 있다. 본 실험에서는 기존의 우량품종(영덕벼, 일품벼)에 MNU를 처리하여 여러 가지 유용한 돌연변이체를 얻을 수 있었다. 특히, 저 phytate 산을 가지는 것으로 보이는 돌연변이체를 선발함에 있어서 벼의 수정란에 돌연변이원인 MNU를 처리하는 방법을 실시하여 실질적으로 특정 단계에서 저 phytate 산을 함유하는 것으로 여겨지는 돌연변이체가 다수 유기되었다. MNU 처리에 의한 많은 유용한 돌연변이를 얻고자하는데는 벼의 수분과 수정에 의해 난세포의 분열과정 중에 특정의 적절한 시기에 돌연변이원이 알맞은 영향을 미치는가가 중요한 의미를 갖는 것이라 할 수 있다.(표 1, 2) 처리에 따른 외부의 환경적 영향은 일부 품종과 각종 작물 및 다양한 식물의 특성에 따라 조금씩 차이는 보이는 것으로 여겨지며, 처리에 적절한 조건과 그 조건에 따른 수행방법을 구분하여 보면 다음과 같다.

가. 일차적으로 벼의 중복수정으로 이는 벼에서는 정핵과 난핵의 수정, 정핵과 극핵의 수정이라는 수분의 수정에 이르는 두가지의 수정이 동시에 이루어진다. 이 과정을 거쳐서 각 영역이 어느정도로 세포분열의 과정이 진행되어 있으며 이때 돌연변이원이 어떠한 영향을 미

치는가는 각종 돌연변이가 생성되는데 가장 중요한 시기라고 보여진다.

표 1. 영덕벼의 수정란에 MNU처리에 따른 제반 사항

단계	수분후 경과시간	처리시간	pH	온도(내부)	온도(외부)
1	8hr	8:15	4.8~5.0	27	21
2	9hr	9:15	4.8~5.0	27	20.5
3	10hr	10:15	4.8~5.0	26	20
4	11hr	11:15	4.8~5.0	28	20
5	12hr	12:15	4.8~5.0	29	19.5
6	13hr	1:15	4.8~5.0	27	19.5
7	14hr	2:15	4.8~5.0	28	19
8	15hr	3:15	4.8~5.0	27	19
9	16hr	4:15	4.8~5.0	27	19
10	17hr	5:15	4.8~5.0	27	19
11	18hr	6:15	4.8~5.0	28	19.5
12	19hr	7:15	4.8~5.0	27	19.5
13	20hr	8:15	4.8~5.0	27	19
14	21hr	9:15	4.8~5.0	27	19.5
15	22hr	10:15	4.8~5.0	27	19.5

표 2. 일품벼의 수정란에 MNU처리에 따른 제반 사항

단계	수분후 경과시간	처리시간	pH	온도(내부)	온도(외부)
1	8hr	8:00	4.8~5.0	26	19
2	9hr	9:00	4.8~5.0	26	19
3	10hr	10:00	4.8~5.0	26	19
4	11hr	11:00	4.8~5.0	25	19
5	12hr	12:00	4.8~5.0	26	19
6	13hr	1:00	4.8~5.0	26	18.5
7	14hr	2:00	4.8~5.0	26	18.5
8	15hr	3:00	4.8~5.0	27	18.5
9	16hr	4:00	4.8~5.0	26	18.5
10	17hr	5:00	4.8~5.0	25.5	18
11	18hr	6:00	4.8~5.0	26	18
12	19hr	7:00	4.8~5.0	26	18
13	20hr	8:00	4.8~5.0	26	18.5
14	21hr	9:00	4.8~5.0	26	19
15	22hr	10:00	4.8~5.0	25	20

[수행방법]: 중복수정에 따른 돌연변이원이 적절한 시기에 영향을 주게하기 위해서 처리의 단계를 1단계(수분(개화) 후 8시간 경과시점)~15단계(수분(개화) 후 22시간 경과 시점)로 1시간 간격으로 실시하여 처리에 따른 각종 돌연변이의 발생에 효율성을 높이고자 하였음.

나. 돌연변이원인 처리액의 온도

[수행방법]: 처리대상인 각각의 영화에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 처리당시 처리장소의 온도와도 밀접한 관계가 있으므로 처리용기내에 온도계를 설치하여 처리장소의 실온과 비교하며 그 온도의 변화를 관찰 한다.

다. 돌연변이원의 처리장소에 실내온도

[수행방법]: 처리장소는 협소하고 처리당시 처리에 관여하는 인원의 수와도 밀접한 관계가 있으며 주변의 다른 기계의 영향도 고려하여 적절한 장소를 물색하여야 한다.

라. 돌연변이원의 처리장소에 광조건

[수행방법]: 처리장소의 조건과 일맥상통하는 것으로 MNU는 특히 광분해성이 강하여 자연광이나 형광등 등의 빛에도 민감한 반응을 보임으로 가능한한 빛의 차단에 유념하고 작업의 효율성을 위해서는 MNU의 특성상 붉은색의 빛에는 광분해가 없는 장점을 십분이용하여 작업을 실시하고 빠른 시간내에 처리 작업을 끝내고 다시 암흑의 조건을 유지하도록 한다.

마. 돌연변이원의 처리농도

[수행방법]: 돌연변이원의 처리농도는 무엇보다도 중요하며, 특히 대상작물에 따라 그에 따른 적절한 농도가 수반되어야 하며 농도의 차이는 그 대상식물의 치사치와도 직결되어 있으므로 반복실험에 따른 결과를 종합하여 결정하여야 한다.

바. 돌연변이원의 pH

[수행방법]: 수정된 난의 세포는 특히 돌연변이원의 pH에 밀접한 영향을 입을 것으로 여겨지는데 돌연변이원의 처리액을 농도에 조정과 함께 pH의 측정을 확실히 하여야 한다. 특히 처리액을 조제함에 있어서 준비된 증류수의 상태와도 밀접한 관계가 있음을 유념해야 한다.

사. 돌연변이원의 처리시간

[수행방법]: 돌연변이원의 처리시간은 다양하다고 볼 수 있으며, 이는 대상식물의 화기의 조건에 따라 변화가 가능하다. 또한 처리시간에 따라 돌연변이원의 작용이 영향으로 직결되어 있으며, 적절한 돌연변이원의 농도에서 처리시간의 차이는 식물체의 대사작용에 영향을 주며, 돌연변이의 발생기작에도 영향을 미치므로 세분화된 실험의 절차가 있어야 한다.

아. 처리 후 돌연변이원의 제거를 위한 세척 및 세척수의 수은

[수행방법]: 돌연변이원의 처리가 끝난다음 이 돌연변이원의 영향이 지속되는 것을 막고 대상식물의 본연의 생육상태로 가능한 빨리 되돌려 놓기 위해서는 돌연변이원을 제거하고 정상 생육환으로 유지하여 주어야 함으로 수세는 중요하다. 또한 돌연변이원은 인간에게도 위험한 것으로 대상식물의 관리의 안정성을 도모한다는 점에서도 중요한 작업이다. 수세의 정도는 대상식물의 생육에 지장이 없는한 범위에서 가능한한 충분히 실시할 필요성이 있다. 통상의 벼의 경우는 24시간의 범위에서 실시하고 있다.

자. 기타 사항으로는 돌연변이원인 MNU는 인간에 있어서도 그 독성과 돌연변이 유발 가능성이 높은 물질이므로 작업에 있어서 항상 주의를 요하며, 돌연변이의 처리시에는 안전장비(비옷의 착용·장화의 착용·고무장갑의 착용·마스크의 착용)의 착용에 신경을 써야하며, 만일의 경우 처리액이 피부에 접촉되었을 시에는 흐르는 물에 장시간 세척하여 그 위험성의 주의할 필요성이 있으며, 처리가 끝난다음 처리에 사용된 각종 용구 및 처리액은 충분한 시간 자연광 조건하에 두어 MNU의 광분해가 되도록 하며, 처리액의 경우는 광분해후 NaOH을 첨가하여 다시금 분해시킨다.

2. 돌연변이체의 선발

저 phytate산 함유의 돌연변이체를 선발하는 과정은 많은 시간과 노동력을 필요로 하지만 그 결과는 인간에 있어서 매우 유용한 결과를 제공하여 주고 있다. 본 실험을 수행함에 있어서 사실상 돌연변이체의 선발은 M₂세대에서 그 계통이 선발되어야 하나 벼의 수정란에 MNU를 처리하면 그 M₁세대에서 통상처리한 영화의 수 만큼에 종자가 확보되고 M₂세대로 가면 M₁세대 식물체의 영화에서 다시금 무수히 많은 량의 영화가 얻어져 M₂종자를 형성하게 된다. 이와 같은 많은 수의 종자를 전부 조사한다는 것은 불가능에 가깝다. 따라서 본 실험에

서는 일차적으로 M₁종자에서 저 phytate산을 함유하는 계통을 선발하고, 그 이후 계통을 축소시켜서 다시금 저 phytate산 함유의 돌연변이체를 선발하는 방법을 택하였다.(표 3) 그 선발의 과정을 단계적으로 살펴보면 다음과 같다.

가. 영덕벼

영덕벼의 저 phytate산 함유 돌연변이체의 선발은 처리당해의 M₀종자 8,619개의 종자를 파종하고 이것에서 얻어진 M₁종자를 대상으로 일차적인 산분해 비산법의 발색 반응실험을 통하여 선발하였다. 선발된 계통은 전부 3계통에 19개체를 얻을 수가 있었으나 이들의 생육은 전반적으로 부진하였다.(표 4)

이들 19개체 중에서 M₂세대의 식물체까지 생육이 가능했던 계통은 19개체중 3개체만으로 KM20-1-13-7, KM20-6-5-4 및 KM20-13-1-2였으나, 이들의 생육도 기대 이상으로 부진하였다. 결국 이들중 KM20-13-1-2의 경우는 생육상태가 저조하여 종자를 얻을수 없었으며, 월동을 하는 중에 생존에 실패하였다. 이와 같은 결과는 처음의 M₁종자의 상태에서 선발하는 과정에 저 phytate산 함유의 돌연변이체라는 결과로서는 좋은 결과를 보였으나 벼의 생육전반과 영덕벼의 재배상에 문제와 벼의 생리적인 장애가 첨가된 것이 주된 요인이 된 것으로 보여진다. 나머지 2개체의 경우는 그나마 생육이 좋아서 적은수에 불과하지만 종자를 얻을 수 있었으며, 주도 보존이 가능하여 다음해에 다른 실험에 분석자료로 이용할 수 있었다.

나. 일품벼

일품벼의 경우도 앞에서 영덕벼의 경우와 같은 실험을 통하여 돌연변이체를 선발하였는데, 처리당해의 M₀의 종자 11,331개의 종자를 파종하여 이것에서 얻어진 M₁종자를 대상으로 영덕에서와 같이 일차적인 산분해 비산법의 발색반응실험을 통하여 선발하였다. 선발된 계통은 5계통으로 CM5-24-19, CM6-29-18, CM11-23-8, CM13-8-12, CM14-37-7등이었다.(표 5)

이들 5계통을 가지고 세부적인 계통의 선발을 위하여 각 계통별로 34, 36, 78, 60, 21씩의 M₂종자에 대하여 다시 산분해 비산법의 발색 반응실험을 실시하여 48개의 개체를 선발할 수 있었다.(표 6)

이들 48개의 개체는 저 phytate산 함유의 비율은 50%, 70%, 90%로 저하되는 경향을 보

였다. 산분해 비산법의 발색 반응실험을 하고 남은 반쪽의 부분(배를 포함한 부분)은 hormone free의 MS배지에 파종하여 생육시키 후 순화처리용 pot에 이식하여 생육시킨 다음 본답으로 정식 이양하여 재배하였다. 파종으로부터 본답에 이양하는 과정에 저 phytate산 함유 돌연변이체의 경우 일부 개체에서 embryo death 현상과 albino 현상이 발생하여 총 48개 체중 38개체만이 생존하였으나 본답의 생육과정에서 다시 3개체가 생존하지 못하여 결국 35개체에 의한 계통을 유지할 수 있었다. 이들의 저 phytate산 함유 돌연변이체는 각종 생육조사 및 F₁의 유전력 조사등의 자료로 이용할 수 있었다.

표 4. 영덕벼의 M₁종자로부터 선발된 저 phytate산 함유 돌연변이체의 계통

계통	처리시간	1차세부계통	2차세부계통	3차세부계통
영덕벼 (KM)	20hr	1	13	1
				2
				3
				5
				6
				7*
		6	5	1
				3
				4*
				5
				6
				7
		13	1	8
				9
				1
				2
				3
				4
				5
총계				19

* 최종적으로 생존하여 선발 유지된 계통

표 5. 일품벼의 돌연변이 Mi종자로부터 저 phytate산 함유 돌연변이체의 선발

계통	Phytateks 저하 정도(%)			조사수(개)
	50%	70%	90%	
CM1-20-16	2			10
CM1-39-10	1			10
CM2-none				10
CM3-none				10
CM4-6-1	3			10
CM4-16-15	2	1		10
CM4-22-16	1			10
CM5-12-14	4			10
CM5-24-19*			5	44
CM5-26-16	1			10
CM5-33-6	1			10
CM6-29-18*	1	7	4	46
CM6-37-1	2			10
CM7-6-6		1		10
CM7-23-15	1			10
CM7-29-19	1			10
CM8-none				10
CM9-none				10
CM10-8-4	1			10
CM10-15-11		2		10
CM10-41-20	1			10
CM11-23-8*	2	9	9	88
CM12-3-8	1			10
CM13-2-4		2		10
CM13-8-12*	3	14	4	70
CM13-24-11	1			10
CM14-16-17*			8	31
CM14-37-7	1			10

* 90% 이하의 phytate산 함유의 감소로 선발된 계통

표 6. 일품벼의 돌연변이 M₂종자로부터 저 phytate산 함유 돌연변이체의 선발

계통	처리시간	1차세부계통	2차세부계통	3차세부계통	4차세부계통
일품벼 (CM)	12hr	5	24	19	14***
	13hr	6	29	18	6** 19* 28** 32*** 33**
	18hr	11	23	8	1** 5** 7*** 10* 13** 17** 21** 25*** 32*** 34*** 36** 42* 44*** 53*** 63** 64** 69** 76***
	20hr	13	8	12	6* 12*** 14* 17** 26** 31** 35*** 44** 56** 60**
	21hr	14	37	7	17*** 18*** 19*** 20***
총계					38

* 50% 이하의 phytate산 함유의 감소로 선발된 계통
 ** 70% 이하의 phytate산 함유의 감소로 선발된 계통
 *** 90% 이하의 phytate산 함유의 감소로 선발된 계통

각의 돌연변이체를 pot별로 유지하여야 한다는 어려움이 있다. 춘천 지방의 경우 겨울철의 기온이 급 하강하고 일조의 조건도 양호한 편이 아니기 때문에 유지의 어려움이 가중된다.

3. 돌연변이체들의 재배 및 농업형질 조사

돌연변이체들의 재배와 농업형질의 조사는 본 실험의 연구에 있어서 최종적으로 남아 있는 결과를 대변하는 것으로 매우 중요한 것이다. 특히 돌연변이체들의 경우 일반품종의 재배와 대동상이 한 것이어야 한다. 이것은 그 결과인 돌연변이체에서 생산된 결실이 최종적으로 농민이 재배해야 함으로 전체적인 농민의 재배에서 벗어남이 없어야 한다. 따라서 선발의 과정과 재배의 과정에서도 가능한한 강원대학교 부속농장의 관행법을 위주로 실시한 이유라고도 설명할 수 있다. 이양의 문제는 돌연변이체는 하나하나의 개체가 다른 특성을 보일 가능성이 있기 때문에 그 결과가 고정되기 전에는 1주1모를 기본으로 손이앙에 의존한 점만이 다르다고 볼 수 있다. 돌연변이체의 재배에 대한 그 결과를 서술하여 보면 다음과 같다.

가. 본포장에서의 재배

전체 재배면적 600평 정도에서 실시하였는데, 재배의 실험방법에서 설명한 것과 같이 충분한 재식거리는 각각의 돌연변이체의 분얼력을 왕성히 조장하여 각각의 돌연변이체에 대한 생산량을 증대시키는 작용을 하였다. 또한, 처리구간의 넓이는 작업의 편의성을 도모하여 양호한 관찰을 실시 할 수 있었다. 양영생장기의 생육에 이상을 보이는 돌연변이체의 발견은 그 관찰이 주된 관건이므로 재식거리의 확보와 적효하였다고 평가된다. 단 M_1 식물체의 숫자가 많은 경우에는 그 식부면적이 너무 많이 소요되고 관리상에 어려움이 있다는 단점이 있고, 넓은 면적을 관리함에는 각종 돌연변이체의 각각의 생육특성상 성장정도가 틀리기 때문에 관리의 어려움이 가중된다. 특히, 조류 및 설치류(쥐)에 의한 피해도 일부 일찍 출수하고 성숙하는 경우에 개체의 피해정도가 심하므로 조기에 방조망과 쥐약 등의 설치가 중요하다. 본 실험에서 선발된 돌연변이에 대한 성과는 각종 M_0 개체에 대한 M_1 종자의 수확이 있었으며, M_2 식물체에 대한 이와 같은 본포장의 재배에서는 화기(꽃)의 이상을 보이는 돌연변이체로 100여종의 돌연변이체를 선발하는 것이 가능하였다. 물론 이와 같은 돌연변이체와 출수기에 관련된 돌연변이체, 엽록소 생성에 이상을 보이는 돌연변이체들도 부수적으로 선발이 가능한 결과를 얻었다.

나. 소단위 하우스 재배

하우스 재배에서는 본포장의 재배의 장점이 간이재배법에 포함된 양식으로 본포장에서와 같이 관개가 비록 수돗물에 의한 의존도가 높다고는 하지만 충분하여 벼의 생육에 있어서 매우 양호한 결과를 보이고 있다. 특히 관찰이 각종 돌연변이체들의 관찰에 의한 선발에 있어서는 폭 4.5m 정도의 포장에 양쪽으로는 통로가 있으며, 포장의 중앙에도 통로가 50cm 정도 설치되어 있어서 매우 양호하였다. 또한, 시기에 따른 낙수에 편리함이 있어서 본포장에서와 같은 작업상의 불편함이 많이 희석되었다.

다만 면적의 확보와 규모에서의 제한성이 있기 때문에 돌연변이체의 전부를 이와 같은 방법으로 생육시키지 못하며, 수돗물에 의한 관개로 인하여 수온의 조절과 관개시설 부위의 벼는 생육에 있어서 일부 지장을 받기도 하는 경향을 보이고 있다. 또 다른 문제점의 하나는 도심의 중앙부에 위치하는 하우스 포장으로 인하여 도심내의 조류에 의한 피해가 극심하다는 것이다. 이를 위해서 방조망을 2중으로 설치하기도 하였으나 한계성이 있었으며, 조류들의 두려움을 조장하기 위하여 허수아비나 육상 스포츠에서 사용되는 스타트 총과 어린이들의 모형 공기총인 비비탄 총등을 동원하여 조류의 피해에 대비하기도 하였으나 그 어려움은 여전하다. 소단위 하우스 재배의 가장 큰 장점으로 본 실험에서와 같이 벼의 수정란에 돌연변이 원인 MNU를 처리할 경우 그 대상 식물체의 생육조건이 본답의 벼에 생육조건과 유사한 경우가 가장 유리한 조건으로 여겨진다. 때문에 실질적으로 본답에서 필요한 품종에 대한 재배·생육을 실시하고 그곳에 실험실을 설치하여 처리하는 것이 좋은 방법이라 할 수 있다. 하지만 그와 같은 처리에도 제반의 시설이 설치되어 있는 경우에만 가능한 것이라 할 수 있을 것이다. 때문에 처리의 목적상 처리 전일 에 pot에 처리대상의 식물체를 담아서 제반 작업을 실시하고 있다. 이때 본답과의 거리가 멀면 멀수록 그 대상 식물체를 이송하여야 하고 이송중에 이송수단에도 문제가 있지만 처리대상 부위에 해당하는 출수된 이삭이 자연풍이 아닌 차량의 속도에 의한 미풍에도 영향을 입어 탈수분 상태로 되는 수분장해를 입는 경우가 다수 발생한다. 이와 같은 경우에 비하여 소단위 하우스형 재배에 의한 경우는 처리대상의 식물체를 채취하는 것과 채취에 있어서 그 식물체의 생육상의 진행정도를 정확히 관찰 할 수 있었다는 것이 편리하여 그 무엇 보다도 유리한 재배법의 평가된다.

다. Pot에서의 재배

Pot에 의한 재배는 관개에 대한 문제점과 전체적인 식물체의 생육에 있어서 제한적인 면적에서 극한된 환경에 적응하며 생육된다는 조건이 부여되지만, 육종의 연구목적에있어서는 계통의 유지와 작업의 효율성에 있어서 없어서는 안되는 재배양식의 하나라고 볼 수 있다.

본 실험에서는 각 돌연변이 개체를 pot에서 재배하여 생육조사의 효율성을 기하고, 유전력 검정을 위한 교배의 실험에서도 각각의 돌연변이체를 pot로 재배하여 효율성을 높일 수 있었다. Pot 재배의 관리적인 면에서는 최초 토양을 준비할 때 토양에 밑거름을 주고 재배를 실시하여 생육에 따른 상태의 진전에 따라 추비와 엽면시비를 실시하여 생육중인 벼의 영양적 결핍현상이 일어나지 않도록 하였다. 경우에 따라서는 계분을 소량 공급하여 질소질 비료의 대응으로 시비하기도 하였으나 pot의 용적이 작은 관계로 큰 효과는 없었다. 반면, 생육중인 각종 돌연변이체의 RTC(root tip cell)의 채취와 같은 작업에는 매우 용이하였다.

Pot재배의 최대의 단점이라고 여겨지는 관개는 간이 물탱크식 수조를 제작하여 pot의 밑부분에 구멍을 내고 pot를 수조에 넣어서 재배하는 양식을 취하여 본포장이 나 소단위 하우스형의 효과를 일부 도용하여 재배하기도 하였다. 이와 같은 재배는 pot재배에서 자주 발생하기 쉬운 수분결핍의 현상을 가능하면 적게 하는데 많은 도움을 주었다.

라. 월동기간의 재배

춘천의 경우의 겨울철이 길고 기온도 급하강 하는 경향이 뚜렷하여 월동에 따른 재배의 준비를 서둘러야 한다. 월동을 위한 재배의 양식은 pot재배에 기초를 둔 것으로 본포장이나 소단위 하우스, por재배에서 이용되었던 각종 돌연변이체의 수확을 끝내고, 그 식물체의 지상부는 그루터기를 포함하여 식물체의 크기가 15~20cm 정도가 되도록 자른 후, 지하부의 뿌리는 불필요한 용적을 차지하는 것을 제거하고, 분얼경에서도 생육상태가 저조하고 이미 고사한 것을 제거한다. 이와 같은 상태의 분지체를 갈색의 원통형 pot에 담아서 일반 pot재배에서와 같은 방법으로 월동기간에 따른 재배를 시작한다. 이때 일반 pot재배와 다른 점은 pot의 밑바닥에 구멍이 있는 상태로 재배하여 수분이 pot내에 담수되는 것을 방지한다.

월동기간중에는 생육환경이 초자실이고 기온의 하강에 따른 환기의 조건이 불량하여 전반

적인 생육조건은 과습한 상태이므로 pot에 담수상태가 지속되면 뿌리의 부패와 노후화된 줄기의 부패가 심화되어 생육이 저조하게 되며 심한 경우는 월동기간 중의 생존을 불가능한 상태로 만들기도 한다. 이와 같은 갈색의 원통형 pot가 대표적으로 월동기 재배에 이용되나 대상식물의 양적인 제한을 받기 때문에 경우에 따라서는 이동에 불편함을 감수하고 파종용 상자를 이용하여 다수의 개체를 이식하여 월동기간중의 재배를 실시하기도 한다.

마. 기타의 재배

기타의 재배로는 pot 재배에서도 경우에 따라서는 방조망을 설치하여야 하며, 때로는 암막을 설치하여 이곳에서 일장 및 일조의 제한적 처리를 실시하여 재배하는 방법을 이용하기도 한다. 이와 같은 암막을 설치하여 재배하는 이유는 각각의 돌연변이체의 경우 재배·생리상에 생육단계가 다르므로 실험의 목적상 그 생육단계를 일률적으로 조절할 필요성이 있다. 이때 많이 이용되는 재배양식이 암막을 이용하는 것으로 이 암막에서 주간(주간)의 일장조건을 8시간 야간의 조건을 16시간 정도로 조정할 경우 외부의 온도조건은 벼의 재배·생리상 호조건이며, 일장의 영향은 생육전환기를 부여하게 됨으로 출수기를 앞당기게 된다. 이와 같은 생리특성을 이용하여 기존의 각 개체를 단계별로 암막에서 재배하면 그 시기를 일률적으로 조절하여 목적으로 하는 결과를 얻어서 실험에 이용하게 된다.

농업형질에 대한 조사는 각종 돌연변이체의 특성을 파악하고 기존의 품종과의 비교에 이용되는 것으로 중요하고 특히, 선발된 돌연변이의 재배 및 생육에 특성을 이해하는데 필요한 자료이다. 이와 같은 농업형질에 따라 진정으로 재배양산 체계를 결정하는 지표로 사용된다. 각 조사항목은 다음과 같으며, 그에 따른 저 phytate산 함유의 돌연변이체들의 결과를 요약하였다.(표 7)

- 가. 파종일: 종자를 침종하여 최아된 종자를 이계이앙모판에 파종한 일자
- 나. 이앙일: 파종된 종자가 건묘로 생육하여 본엽이 5~7매 출엽하여 이앙한 일자
- 다. 출수시: 처음으로 이삭이 출수한 일자
- 라. 출수기: 총경수의 40%가 출수한 일자
- 마. 수전기: 총경수의 80%가 출수한 일자

- 바. 성숙기: 대부분의 이삭이 황화한 일자
- 사. 초장: 지면에서 최장엽의 선단까지의 길이
- 아. 간장: 지면에서 이삭목까지의 길이
- 자. 수장: 이삭목에서 수선까지의 길이; 망은 제외
- 차. 분얼경수: 경의 총수; 엽이 2엽이상 전개한 것
- 타. 수수: 출수된 이삭의 총수

표 7. 일품벼에 저 phytate산 함유 돌연변이체들의 생육조사표

	파종일(일)	이앙일(일)	출수시(일)	출수기(일)	수전기(일)	성숙기(일)
Ilpumbyeo	4월 30일	5월 30일	8월 24일	8월 29일	9월 5일	10월 15일
CM6-29-18-19	4월 30일	5월 30일	8월 17일	8월 20일	9월 25일	10월 15일
CM11-23-8-10	4월 30일	5월 30일	8월 22일	8월 25일	9월 29일	10월 15일
CM11-23-8-42	4월 30일	5월 30일	8월 17일	8월 21일	9월 29일	10월 15일
CM13-8-12-6	4월 30일	5월 30일	8월 18일	8월 21일	9월 26일	10월 11일
CM13-8-12-14	4월 30일	5월 30일	8월 15일	8월 19일	9월 25일	10월 11일
CM6-29-18-6	4월 30일	5월 30일	8월 29일	8월 33일	9월 9일	10월 15일
CM6-29-18-28	4월 30일	5월 30일	8월 17일	8월 20일	9월 25일	10월 15일
CM6-29-18-33	4월 30일	5월 30일	8월 18일	8월 21일	9월 27일	10월 12일
CM11-23-8-1	4월 30일	5월 30일	8월 27일	8월 29일	9월 17일	10월 15일
CM11-23-8-5	4월 30일	5월 30일	8월 17일	8월 21일	9월 26일	10월 13일
CM11-23-8-13	4월 30일	5월 30일	8월 19일	8월 24일	9월 29일	10월 14일
CM11-23-8-17	4월 30일	5월 30일	8월 20일	8월 23일	9월 27일	10월 14일
CM11-23-8-21	4월 30일	5월 30일	8월 19일	8월 23일	9월 27일	10월 14일
CM11-23-8-36	4월 30일	5월 30일	8월 22일	8월 26일	9월 30일	10월 16일
CM11-23-8-63	4월 30일	5월 30일	8월 19일	8월 22일	9월 26일	10월 12일
CM11-23-8-64	4월 30일	5월 30일	8월 18일	8월 23일	9월 28일	10월 15일
CM11-23-8-69	4월 30일	5월 30일	8월 29일	8월 31일	9월 10일	10월 15일
CM13-8-12-17	4월 30일	5월 30일	8월 29일	8월 31일	9월 10일	10월 13일
CM13-8-12-26	4월 30일	5월 30일	8월 17일	8월 19일	9월 24일	10월 11일
CM13-8-12-60	4월 30일	5월 30일	8월 16일	8월 19일	9월 24일	10월 11일
CM5-24-19-14	4월 30일	5월 30일	8월 24일	8월 27일	9월 31일	10월 20일
CM6-29-18-32	4월 30일	5월 30일	8월 19일	8월 22일	9월 27일	10월 16일
CM11-23-8-7	4월 30일	5월 30일	8월 23일	8월 27일	9월 29일	10월 15일
CM11-23-8-25	4월 30일	5월 30일	8월 13일	8월 17일	9월 22일	10월 13일
CM11-23-8-32	4월 30일	5월 30일	8월 19일	8월 22일	9월 28일	10월 14일
CM11-23-8-34	4월 30일	5월 30일	8월 22일	8월 27일	9월 31일	10월 19일
CM11-23-8-44	4월 30일	5월 30일	8월 20일	8월 24일	9월 29일	10월 18일
CM11-23-8-53	4월 30일	5월 30일	8월 22일	8월 25일	9월 31일	10월 19일
CM11-23-8-76	4월 30일	5월 30일	8월 24일	8월 28일	9월 31일	10월 19일
CM13-8-12-12	4월 30일	5월 30일	8월 22일	8월 26일	9월 31일	10월 18일
CM13-8-12-35	4월 30일	5월 30일	8월 18일	8월 23일	9월 29일	10월 14일
CM14-37-7-17	4월 30일	5월 30일	8월 13일	8월 17일	9월 28일	10월 13일
CM14-37-7-18	4월 30일	5월 30일	8월 20일	8월 23일	9월 29일	10월 15일
CM14-37-7-19	4월 30일	5월 30일	8월 20일	8월 23일	9월 28일	10월 19일
CM14-37-7-20	4월 30일	5월 30일	8월 23일	8월 27일	9월 31일	10월 21일

	초장 (cm)	간장 (cm)	수장 (cm)	분얼경(개)	수수(개)
Ilpumbyeo	86	59	17.5	39	29
CM6-29-18-19	83	46	11	34	32
CM11-23-8-10	95	49	19.7	38	32
CM11-23-8-42	90	57	19	39	31
CM13-8-12-6	87	61	19.5	33	23
CM13-8-12-14	88	60	17.5	37	31
CM6-29-18-6	90	53	19	45	23
CM6-29-18-28	99	51	18	53	50
CM6-29-18-33	92	50	19	37	31
CM11-23-8-1	94	52	19	48	32
CM11-23-8-5	96	57	24	37	34
CM11-23-8-13	94	60	22.8	29	29
CM11-23-8-17	106	53.6	20.5	39	30
CM11-23-8-21	94	55.5	21	34	32
CM11-23-8-36	96	58	19	39	33
CM11-23-8-63	105	59	18	32	28
CM11-23-8-64	106	56	17.5	40	26
CM11-23-8-69	94	59	22	29	28
CM13-8-12-17	93	63.5	21	34	34
CM13-8-12-26	97	67	21	38	37
CM13-8-12-60	109	68.5	22.7	32	32
CM5-24-19-14	97	59	17.5	41	34
CM6-29-18-32	100	52	20.5	48	38
CM11-23-8-7	98	46	18	49	24
CM11-23-8-25	102	58	23.5	34	30
CM11-23-8-32	98	57	23	44	40
CM11-23-8-34	91	59	19.5	46	38
CM11-23-8-44	95	58	16	40	37
CM11-23-8-53	91	51	15.5	26	23
CM11-23-8-76	96	57	22	41	31
CM13-8-12-12	90	59	22	46	27
CM13-8-12-35	98	58	22.5	32	27
CM14-37-7-17	113	56	25	40	35
CM14-37-7-18	93	61	21	41	37
CM14-37-7-19	98	63	16	43	37
CM14-37-7-20	94	66	17	45	23

4. Phytate 저함량 계통선발 및 유전분석

가. 영덕벼에서 얻어진 저 phytate산 함유 돌연변이체

저 phytate산 함유 돌연변이(LPM)계통의 선발 및 유전분석으로는 공시품종 영덕벼에서 현재 2계통 KM20(1-13-7, 6-5-4)가 서로 교배되어, 현재 강원대학교 부속농장의 실험포장에서 재배되었으며, 유전력 조사를 위해 얻어진 F₁과 각각의 양친과 교배된 backcross 세대(B₁)도 공히 재배하였다.(표 8)

또한, 유전력 검정조사를 위한 2계통간의 교배의 결과는 표 8에서와 같이 총42개의 종자가 확보 되었으나 재배 및 생육을 고르게 하기 위해서 F₁의 3개의 종자와 B₁은 각각 10개의 종자를 파종하여 재배되었는데 이들 중에서 전체 19개체가 생존하여 재배되었다. 4개의 개체

는 돌연변이 특성상 배(embryo)의 이상 형성에 의해 생존하지 못하고 죽은 것으로 사료된다. 이들 돌연변이체들은 전반적으로 생육은 일반 재배품종과 비슷한 경향을 나타내어서 결실을 거둬서 종자의 증식에는 문제가 없었으며, 다음 단계의 phytate산의 함량 분석이나 유전력 검정 분석에 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

표 8. 영덕벼의 LPM 계통간에 교배결과 및 생존 개체수에 따른 유전력 검정

KM20-6-5-4 x KM20-1-13-7	: F ₁ 3종자	: 3개체 생존 / 3종자 파종
KM20-6-5-4 x 영덕	: F ₁ 23종자	: 7개체 생존 / 10종자 파종
KM20-1-13-7 x 영덕	: F ₁ 16종자	: 9개체 생존 / 10종자 파종

나. 일품벼에서 얻어진 저 phytate산 함유 돌연변이체

공시품종인 일품에서 얻어진 5계통 CM(5-24-19, 6-29-18, 11-23-8, 13-8-12, 14-37-7)은 증식을 시켜서 각각의 개체에서 종자를 얻었으며, 이들 5계통에서 얻어진 M₂종자를 이용하여 산분해 비색법에 따른 발색반응 실험으로 phytate acid 감소 정도를 조사한 결과 50%, 70%, 90%의 감소를 보이는 M₂종자를 48개 얻을 수 있었다. 이들 종자는 반(배유쪽)이 phytate산 반응실험에 사용되었기 때문에 나머지 반쪽(배를 포함한 쪽)을 hormone free의 MS배지에 파종하여 생육시킨 후 재배하여 교배 및 각 실험에 사용하였다.

48계통중 38계통은 일단의 생존에는 성공하였다.(표 9) 생존에 실패한 10개의 계통은 embryo death현상과 albino현상이 발생하였기 때문에 사료되며 저 phytate산을 가지는 돌연변이체의 경우 호분층에 이상이 생겨서 phytate산 함량이 낮아짐과 동시에 일부의 벼 생리적 메가니즘에서도 변이를 보여 생육상에 장애를 받기도 하는 것으로 사료된다.

표 9. 일품벼에서 LPM 계통으로 선발된 돌연변이체의 보유현황

50% LPM 계통:	CM ₂ [6-29-18-19, 11-23-8(10, 42), 13-8-12(6, 14)]
70% LPM 계통:	CM ₂ [6-29-18(6, 28, 33), 11-23-8(1, 5, 13, 17, 21, 36),

63, 64, 69), 13-18-12(17, 26, 31, 44, 56, 60)]
 90% LPM 계통: CM₂ [5-24-19-14, 6-29-18-32, 11-23-8(7, 25, 32, 34, 44,
 53, 76), 13-8-12(12, 35), 14-37-7(17, 18, 19, 20)]
 Backcross 품종: 일품벼

* 선발된 돌연변이체 수: 38개

5. 저 phytate 계통선발

일품벼 저 phytate산 함유 돌연변이체중 일동에 성공하고 증자를 확보한 35개의 계통에 대하여 1차적으로 각 계통당 저 phytate산 함유를 보이는 M₂종자(표 10)를 10개씩 채취하여 이들에 대하여 산분해 비산법으로 발색반응 실험을 실시하여 돌연변이체에 대한 선발을 실시하였다.

이렇게 선발된 각 계통의 개체는 1차년도 재배양식에서와 같이 배지에서 재배한 후 순화과정을 거쳐 소단위 하우스에 이식한 후, 이들 개체로부터 다시금 M₃종자를 생산하였다. M₂종자 35개에 대하여 발색반응의 결과는 P1=CM13-8-12-14의 경우는 대부분이 정상으로 확보된 결과를 보였으며, 각각의 돌연변이 개체를 순화하여 이식하는 과정에 일부의 경우는 적응에 실패하여 치사 하였다.

결국 얻어진 돌연변이체는 296개체이며, 이들 또한 생육중에 적응력 부족으로 8개체가 치사하여 결국 288개의 돌연변이체에 대하여 M₃ 종자의 수확이 이루어졌다.

M₃종자들에 대한 저 phytate산 함유의 결과도 각 개체에서 얻어진 종자를 5개씩 자료로 채취하여 앞에서와 같은 방법으로 결과를 얻는 과정의 반복하여 저 phytate산 함유 돌연변이체를 선발·유지할 수가 있었다.(표 11)

표 10. 일품벼에서 유기된 M₂종자 35계통에 대한 phytate산 함유의 결과

돌연변이 계통명	종자의 반복수									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P1=CM13-8-12-14	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-
P2=CM11-23-8-10	***	***	***	-	***	***	***	**	***	**
P3=CM11-23-8-42	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P4=CM6-29-18-19	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***
P5=CM13-8-12-6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P6=CM11-23-8-5	***	**	**	***	**	***	***	**	**	**
P7=CM13-8-12-17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

P8=CM6-29-18-6	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P9=CM11-23-8-1	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P10=CM6-29-18-33	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***
P11=CM11-23-8-63	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P12=CM11-23-8-36	***	**	**	**	**	**	**	**	**	**
P13=CM11-23-8-17	***	***	***	***	***	***	***	**	**	**
P14=CM11-23-8-69	**	**	**	**	-	**	**	**	**	**
P15=CM11-23-8-13	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P16=CM11-23-8-64	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***
P17=CM13-8-12-86	**	*	**	**	**	*	*	*	**	**
P18=CM13-8-12-60	*	*	**	*	*	**	*	*	**	*
P19=CM6-29-18-28	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P20=CM11-23-8-21	***	***	**	***	**	**	***	**	**	**
P21=CM11-23-8-32	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P22=CM11-23-8-34	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P23=CM11-23-8-25	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P24=CM11-23-8-7	***	***	***	***	***	**	**	***	***	***
P25=CM14-37-7-17	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P26=CM13-8-12-12	***	**	**	**	***	***	*	**	**	**
P27=CM5-24-19-14	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P28=CM14-37-7-20	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P29=CM11-23-8-44	**	**	***	**	**	**	**	**	**	**
P30=CM6-29-18-32	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P31=CM11-23-8-53	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P32=CM14-37-7-19	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P33=CM13-8-12-35	*	**	*	**	**	**	**	**	*	*
P34=CM14-37-7-18	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P35=CM11-23-8-76	**	**	***	**	**	**	**	***	**	***
lipumbyeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 감소의 경향이 보이지 않음
 * 50% 감소의 경향
 ** 70% 감소의 경향
 *** 90% 감소의 경향

표 11. 일품벼에서 유기된 M3종자 288계통에 대한 phytate산 함유의 결과

돌연변이 계통명	계통반복수	종자의 반복수				
		1	2	3	4	5
P1=CM13-8-12-14	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	***
	3	-	-	-	**	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
	6	-	**	-	**	-
	7	**	**	***	***	**
	8	-	-	-	-	-
	9	***	***	***	***	**
P2=CM11-23-8-10	1	-	-	**	-	**
	2	***	***	***	***	***
	3	***	***	***	***	***
	4	**	**	**	*	**
	5	***	***	***	***	***
P3=CM11-23-8-42	1	***	***	***	***	***
	2	***	***	***	***	***
	3	***	***	***	***	***
	4	***	***	***	***	***
	5	***	***	***	***	***
P4=CM6-29-18-19	1	***	***	***	***	***
	2	***	***	***	***	***

P13=CM11-23-8-17

P14=CM11-23-8-69

P15=CM11-23-8-13

P16=CM11-23-8-64

P17=CM13-8-12-26

P18=CM13-8-12-60

P19=CM6-29-18-28

P20=CM11-23-8-21

- 감소의 경향이 보이지 않음
 * 50% 감소의 경향
 ** 70% 감소의 경향
 *** 90% 감소의 경향

6. 돌연변이 계통간의 교배

생존한 38계통중에서 생육상태가 양호한 35계통을 선택하여 증식과 생육조사 및 유전력 검정 조사의 일환으로 교배를 실시하였다. 이들 일품벼의 LPM계통의 교배조합은 실질적으로 620조합에 이루나 각 돌연변이체들의 출수기를 암막을 통한 재배로 일치하도록 하였음에도 불구하고 교배가 가능했던 조합은 210개에 불과한 것이었다. 하지만 이와 같은 210개의 교배 조합에 의한 F₁의 유전력 조사의 결과 저 phytate산 함유 돌연변이체(LPM) 계통간에는 적어도 2개의 연관군이 있음을 알수 있었다. 교배된 F₁종자들은 다른 분석을 위해서 종자를 증식시키기 위해 현재 강원대학교 부속농장 실험포장에서 생육시키고 있으며, 현재 채종이 되어 저 phytate산 함량의 비율을 검토하는 단계에 있다.(표 12)

저 phytate산 함유 돌연변이체들간의 유전력 검정(표 12)에 의해 대립성을 보이는 F₁ 중 일품벼에서 유기된 돌연변이체 M₂ 세대에서 38계통중 2개의 연관군이 있음을 보였기 때문에 각 연관군에서 3계통, 대립 유전성을 보이지 않는 3계통, 여교배에 의한 9계통 등 총 19계통을 배지에 파종하여 순화시켰으며, 이들은 이식·이양하여 생육시켰으며 이들에 대한 M₃종자도 현재 수확하여 저 phytate산 함량의 정도를 조사하고 있는 중에 있다.

또한, 영덕벼에서 유기된 돌연변이 M₃ 및 일품벼에서 돌연변이로 유기된 M₃세대의 새로운 계통도 유지하기 위하여 배지에 파종하여 순화 생육시켰으며, 영덕벼에서 유기된 돌연변이 M₂ 2계통을 포함한 일품벼에서 돌연변이로 유기된 M₂의 38계통을 합한 총40계통(일부의 계통은 겨울철 보존중 생육이 부진하여 생존 못함; 생존계통 37개)들도 종자의 대량 증식을 통하여 수확을 거두었다. 이들 계통에 대한 저 phytate산 함량의 결과는 일품벼에서 얻어진 35계통에 대해서는 산분해 비산법을 통하여 그 결과를 알 수 있었다.(표 13) 이와 같이 증식된 종자와 유지된 계통들은 phytate함량과 제반 형질과의 관계 및 영향(특히 환경 요인)요인 구명을 하도록 하고 있다.

다른 세부과제들과의 연관성을 고려하여 LPM계통의 종자를 수분후 종자형성 단계별로 sampling하여 기초 자료를 확보하도록 하고 있다.

표 12. 일품벼에 저 phytate산 함유 돌연변이체(LPM) 계통간의 교배에 의한 연관군

A 연관군:	CM ₂	11-23-8-21	X	CM ₂	11-23-8-64
	CM ₂	11-23-8-1	X	CM ₂	11-23-8-64
	CM ₂	14-37-7-20	X	CM ₂	11-23-8-44
	CM ₂	11-23-8-76	X	CM ₂	11-23-8-36
	CM ₂	11-23-8-44	X	CM ₂	11-23-8-76
	CM ₂	14-37-7-20	X	CM ₂	6-29-18-6
	CM ₂	11-23-8-53	X	CM ₂	11-23-8-31
	CM ₂	5-24-19-14	X	CM ₂	6-29-18-6
	CM ₂	5-24-19-14	X	CM ₂	11-23-8-34
	CM ₂	11-23-8-69	X	CM ₂	14-37-7-19
	CM ₂	11-23-8-33	X	CM ₂	11-23-8-63
	CM ₂	11-23-8-33	X	CM ₂	6-29-18-6
	CM ₂	11-23-8-32	X	CM ₂	11-23-8-13
	CM ₂	11-23-8-64	X	CM ₂	6-29-18-6
	CM ₂	14-37-7-20	X	CM ₂	11-23-8-34
	CM ₂	11-23-8-33	X	CM ₂	11-23-8-44
	CM ₂	6-29-18-6	X	CM ₂	11-23-8-44
	CM ₂	11-23-8-33	X	CM ₂	11-23-8-34
	CM ₂	11-23-8-76	X	CM ₂	11-23-8-34
	CM ₂	5-24-19-14	X	CM ₂	14-37-7-18
	CM ₂	6-29-18-6	X	CM ₂	11-23-8-69
	CM ₂	11-23-8-7	X	CM ₂	14-37-7-20
	CM ₂	11-23-8-76	X	CM ₂	11-23-8-21
	CM ₂	11-23-8-33	X	CM ₂	11-23-8-7
	CM ₂	11-23-8-33	X	CM ₂	14-37-7-20
	CM ₂	11-23-8-33	X	CM ₂	6-29-18-6
	CM ₂	11-23-8-44	X	CM ₂	14-37-7-18
	CM ₂	11-23-8-33	X	CM ₂	11-23-8-36
	CM ₂	11-23-8-7	X	CM ₂	11-23-8-36
	CM ₂	11-23-8-7	X	CM ₂	5-24-19-14
	CM ₂	14-37-7-19	X	CM ₂	11-23-8-17
	CM ₂	11-23-8-100	X	CM ₂	11-23-8-1
	CM ₂	11-23-8-69	X	CM ₂	11-23-8-63
	CM ₂	11-23-8-69	X	CM ₂	11-23-8-13
	CM ₂	6-29-18-6	X	CM ₂	11-23-8-1
	CM ₂	11-23-8-76	X	CM ₂	11-23-8-33
	CM ₂	11-23-8-44	X	CM ₂	11-23-8-33
	CM ₂	11-23-8-64	X	CM ₂	11-23-8-36
	CM ₂	11-23-8-53	X	CM ₂	11-23-8-10
	CM ₂	11-23-8-17	X	CM ₂	11-23-8-69
CM ₂	11-23-8-35	X	CM ₂	6-29-18-6	
CM ₂	11-23-8-25	X	CM ₂	11-23-8-69	
CM ₂	11-23-8-76	X	CM ₂	6-29-18-32	
CM ₂	14-37-7-19	X	CM ₂	11-23-8-69	
CM ₂	11-23-8-63	X	CM ₂	6-29-13-18	
B 연관군:	CM ₂	6-29-18-32	X	CM ₂	14-37-7-17
	CM ₂	14-37-7-17	X	CM ₂	11-23-8-25
	CM ₂	11-23-8-25	X	CM ₂	6-29-18-23
	CM ₂	11-23-8-25	X	CM ₂	14-37-7-17

표 13. 저 phytate산 함유 돌연변이체(LPM) 계통간의 유전력 검정
(210개의 조합)

A-1:(C)CM11-23-8-76	X	(C)CM11-23-8-44	+
A-2:(B)CM11-23-8-21	X	(B)CM11-23-8-64	-
A-3:(B)CM11-23-8-1	X	(B)CM11-23-8-64	-
A-4:(C)CM14-37-7-19	X	(C)CM11-23-8-53	+
B-1:(A)CM13-8-12-14	X	Ilpumbyeo	+
B-2:(C)CM14-37-7-29	X	(C)CM11-23-8-44	-
B-3:(B)CM11-23-8-69	X	Ilpumbyeo	+
B-4:(C)CM13-8-12-12	X	(C)CM11-23-8-76	+
B-5:(A)CM11-23-8-42	X	(A)CM13-8-12-6	+
B-6:(A)CM13-8-12-14	X	(B)CM13-8-12-60	+
B-7:(A)CM6-29-18-19	X	(A)CM11-23-8-42	+
B-8:(C)CM13-8-12-12	X	Ilpumbyeo	+
B-9:(C)CM11-23-8-76	X	(B)CM11-23-8-36	-
B-10:(A)CM6-29-18-19	X	(A)CM13-8-12-14	+
B-11:(A)CM11-23-8-42	X	(B)CM13-8-12-60	+
C-1:(C)CM11-23-8-44	X	Ilpumbyeo	+
C-2:(C)CM11-23-8-44	X	(C)CM11-23-8-76	-
C-3:(C)CM14-37-7-20	X	(C)CM6-29-18-6	-
C-4:(C)CM13-8-12-12	X	(B)CM11-23-8-63	+
C-5:(C)CM14-37-7-18	X	(B)CM11-23-8-17	+
C-6:(C)CM13-8-12-35	X	(C)CM5-24-19-14	+
C-7:(C)CM13-8-12-35	X	(B)CM11-23-8-5	+
C-8:(C)CM14-37-7-20	X	(C)CM11-23-8-53	+
D-1:(C)CM6-29-18-32	X	Ilpumbyeo	+
D-2:(C)CM6-29-18-32	X	(C)CM14-37-7-17	-
D-3:(C)CM11-23-8-53	X	(C)CM11-23-8-32	-
D-4:(C)CM5-24-19-14	X	(B)CM6-29-18-6	-
D-5:(C)CM13-8-12-35	X	(C)CM11-23-8-25-6	+
E-1:(B)CM13-8-12-56	X	(B)CM6-29-8-6	+
E-2:(C)CM11-23-8-25	X	(B)CM13-8-12-60	+
E-3:(A)CM13-8-12-6	X	(A)CM11-23-8-42	+
E-4:(A)CM5-24-19-14	X	(C)CM11-23-8-34	-
E-5:(B)CM11-23-8-21	X	(C)CM11-23-8-53	+
E-6:(B)CM11-23-8-69	X	(C)CM14-37-7-19	-
E-7:(C)CM11-23-8-53	X	(B)CM11-23-8-63	-
F-1:(C)CM13-8-12-12	X	(B)CM11-23-8-17	+
F-2:(C)CM11-23-8-32	X	Ilpumbyeo	+
F-3:(C)CM14-37-7-17	X	(B)CM13-8-12-60	+
F-4:(C)CM14-37-7-17	X	Ilpumbyeo	+
F-5:(C)CM11-23-8-53	X	Ilpumbyeo	+
F-6:(C)CM14-37-7-17	X	(C)CM11-23-8-25	-
G-1:(C)CM11-23-8-32	X	(B)CM6-29-18-6	-
G-2:(C)CM14-37-7-17	X	(B)CM13-8-12-17	+
G-3:(C)CM11-23-8-32	X	(B)CM11-23-8-13	-
G-4:(B)CM11-23-8-64	X	(B)CM6-29-18-6	-
G-5:(B)CM11-23-8-64	X	(B)CM11-23-8-13	+
G-6:(B)CM13-8-12-31	X	(C)CM14-37-7-18	+
G-7:(B)CM13-8-12-56	X	(B)CM11-23-8-17	+
G-8:(B)CM13-8-12-56	X	Ilpumbyeo	+
G-9:(B)CM13-8-12-56	X	(C)CM5-24-19-14	+
G-10:(A)CM13-8-12-6	X	Ilpumbyeo	+
G-11:(B)CM11-23-8-63	X	(B)CM13-8-12-60	+

G-12:(B)CM6-29-18-33	X	Ilpumbyeo	+
G-13:(A)CM13-8-12-6	X	(B)CM11-23-8-13	+
G-14:(B)CM11-23-8-5	X	(B)CM6-29-18-33	+
G-15:(B)CM11-23-8-36	X	(B)CM11-23-8-69	+
G-16:(B)CM13-8-12-44	X	CM11-23-8-21	+
G-17:(B)CM11-23-8-1	X	Ilpumbyeo	+
H-1:(B)CM13-8-12-17			
H-2:(C)CM14-37-7-20	X	(C)CM11-23-8-34	-
H-3:(C)CM11-23-8-53	X	(C)CM11-23-8-44	-
H-4:(C)CM5-24-19-14	X	Ilpumbyeo	+
H-5:(B)CM6-29-18-28	X	(A)CM13-8-12-6	+
H-6:(B)CM13-8-12-44	X	(C)CM5-24-19-14	+
I-1:(B)CM11-23-8-5	X	(A)CM13-8-12-6	+
I-2:(B)CM13-8-12-6	X	(B)CM11-23-8-63	+
I-3:(B)CM6-29-18-33	X	(B)CM11-23-8-64	-
I-4:(C)CM11-23-8-34	X	(C)CM11-23-8-34	-
I-5:(C)CM11-23-8-33	X	(B)CM13-8-12-6	+
I-6:(C)CM11-23-8-76	X	(C)CM11-23-8-32	-
I-7:(C)CM5-24-19-14	X	(C)CM14-37-7-18	+
J-1:(A)CM11-23-8-42	X	(A)CM11-23-8-10	+
J-2:(A)CM6-29-18-19	X	(C)CM11-23-8-25	+
J-3:(B)CM13-8-12-44	X	(C)CM11-23-8-32	+
J-4:(B)CM6-29-18-6	X	(B)CM11-23-8-69	-
K-1:(B)CM6-29-18-6	X	Ilpumbyeo	+
K-2:(C)CM11-23-8-7	X	(C)CM14-37-7-20	-
K-3:(C)CM11-23-8-7	X	Ilpumbyeo	+
K-4:(C)CM11-23-8-25	X	(B)CM6-29-18-28	+
K-5:(B)CM11-23-8-13	X	Ilpumbyeo	+
K-6:(C)CM11-23-8-76	X	(B)CM11-23-8-21	-
K-7:(C)CM11-23-8-53	X	(C)CM11-23-8-7	-
K-8:(C)CM11-23-8-34	X	(C)CM14-37-7-20	-
L-1:(B)CM11-23-8-1	X	(B)CM6-29-18-6	-
L-2:(A)CM13-8-12-6	X	(B)CM11-23-8-1	+
L-3:(C)CM11-23-8-76	X	(C)CM14-37-7-18	-
L-4:(C)CM11-23-8-76	X	Ilpumbyeo	+
L-5:(B)CM11-23-8-21	X	Ilpumbyeo	+
L-6:(B)CM11-23-8-13	X	(B)CM11-23-8-36	-
L-7:(B)CM13-8-12-60	X	(C)CM11-23-8-25	+
L-8:(B)CM11-23-8-64	X	Ilpumbyeo	+
M-1:(B)CM13-8-12-31	X	(B)CM11-23-8-13	+
M-2:(A)CM13-8-12-14	X	(B)CM11-23-8-63	+
M-3:(C)CM11-23-8-34	X	Ilpumbyeo	+
M-4:(C)CM11-23-8-7	X	(C)CM5-24-19-14	-
M-5:(C)CM14-37-7-19	X	(B)CM11-23-8-17	-
M-6:(C)CM11-23-8-25	X	(B)CM11-23-8-5	+
M-7:(C)CM13-8-12-12	X	(C)CM5-24-19-14	+
M-8:(A)CM11-23-8-10	X	(B)CM11-23-8-1	-
M-9:(C)CM5-24-19-14	X	(B)CM13-8-12-26	+
N-1:(B)CM11-23-8-69	X	(B)CM11-23-8-63	-
N-2:(B)CM11-23-8-69	X	(B)CM11-23-8-13	-
N-3:(B)CM6-29-18-6	X	(A)CM11-23-8-1	-
N-4:(C)CM14-37-7-18	X	(C)CM11-23-8-25	+
N-5:(A)CM11-23-8-42	X	(C)CM14-37-7-17	+
N-6:(C)CM11-23-8-76	X	(B)CM11-23-8-63	-
N-7:(C)CM11-23-8-44	X	(C)CM11-23-8-32	-
N-8:(B)CM11-23-8-64	X	(B)CM11-23-8-36	-
N-9:(C)CM11-23-8-32	X	(B)CM13-8-12-26	+
N-10:(C)CM11-23-8-32	X	(B)CM13-8-12-26	+
N-11:(C)CM11-23-8-53	X	(A)CM11-23-8-10	-
O-1:(B)CM13-8-12-17	X	(C)CM11-23-8-34	+

O-2:(A)CM11-23-8-42	X	Ilpumbyeo	+
O-3:(C)CM14-37-7-20	X	Ilpumbyeo	+
O-4:(A)CM13-8-12-6	X	(B)CM11-23-8-1	+
O-5:(B)CM11-23-8-17	X	(B)CM11-23-8-69	-
O-6:(B)CM11-23-8-17	X	Ilpumbyeo	+
O-7:(B)CM11-23-8-17	X	Ilpumbyeo	+
O-8:(B)CM6-29-18-28	X	(B)CM11-23-8-5	+
O-9:(B)CM6-29-18-28	X	Ilpumbyeo	+
O-10:(A)CM11-23-8-10	X	Ilpumbyeo	+
O-11:(B)CM6-29-18-6	X	(A)CM11-23-8-10	+
O-12:(B)CM11-23-8-5	X	(B)CM6-29-18-6	-
P-1:(C)CM11-23-8-25	X	(A)CM13-8-12-14	+
P-2:(C)CM11-23-8-25	X	(B)CM11-23-8-69	-
P-3:(C)CM11-23-8-25	X	Ilpumbyeo	+
P-4:(C)CM11-23-8-76	X	(C)CM11-23-8-32	-
P-5:(C)CM14-37-7-19	X	(B)CM11-23-8-69	-
P-6:(C)CM14-37-7-20	X	(B)CM13-8-12-60	+
P-7:(C)CM11-23-8-25	X	(C)CM14-37-7-17	-
P-8:(B)CM13-8-12-26	X	Ilpumbyeo	+
P-9:(B)CM13-8-12-56	X	(B)CM11-23-8-36	+
P-10:(B)CM11-23-8-63	X	(B)CM6-29-18-33	-

+ 상보적 관계를 나타냄, - 비상보적 관계를 나타냄

7. 돌연변이체의 재배 및 평가

일품벼의 저 phytate산 함유 돌연변이체로 선발된 35계통에 대한 재배를 원활히 도모하기 위하여 이들 돌연변이체들의 발아력과 발아 후 생존률에 대하여 조사하여 보았다. 발아력은 대부분의 돌연변이체가 95.7%에 달하는 좋은 발아력을 보였으나, 발아한 각 돌연변이체들의 생존률은 84.0%로 다소 저조함을 나타내었다.(표 14) 일반적으로 재배 품종의 경우 발아한 개체는 그 발아율과 비슷한 정도로 생존을 하는 것으로 보고 되어 있는데 본 실험에서 선발된 일품벼의 저 phytate산 함유 돌연변이체들의 경우는 발아율과 생존률에서 11.7%에 달하는 차이를 보였다.

이것은 저 phytate산 함유의 돌연변이체의 경우 phytate산을 형성함에 있어서 식물체내의 생리적 메카니즘에 이상을 더할어 가져온다고 가정지어 볼 수 있으며, 벼의 수분 및 수정에 있어서 일어나는 유전적 분리반응과 배발생에 있어서의 장애요인을 포함하여 배유의 발생과 발달에 있어서 phytate산이 축적되는 호분층의 역할에 의한 영향으로 사료된다.

표 14. 일품벼에서 선발된 저 phytate산 함유 돌연변이체의 발아율과 생존률

돌연변이체 계통명	발아률(%)	생존률(%)
Ilpumbyeo	100	100
P1=CM13-8-12-14	100	90
P2=CM11-23-8-10	90	60
P3=CM11-23-8-42	100	50
P4=CM6-29-18-19	80	40
P5=CM13-8-12-6	90	70
P6=CM11-23-8-5	100	90
P7=CM13-8-12-17	100	100
P8=CM6-29-18-6	100	90
P9=CM11-23-8-1	100	100
P10=CM6-29-18-33	80	60
P11=CM11-23-8-63	100	90
P12=CM11-23-8-36	100	100
P13=CM11-23-8-17	90	90
P14=CM11-23-8-69	90	80
P15=CM11-23-8-13	100	100
P16=CM11-23-8-64	80	80
P17=CM13-8-12-26	100	70
P18=CM13-8-12-60	100	70
P19=CM6-29-18-28	100	100
P20=CM11-23-8-21	100	100
P21=CM11-23-8-32	100	100
P22=CM11-23-8-34	100	90
P23=CM11-23-8-25	100	100
P24=CM11-23-8-7	100	90
P25=CM14-37-7-17	100	70
P26=CM13-8-12-12	100	70
P27=CM5-24-19-14	100	80
P28=CM14-37-7-20	80	80
P29=CM11-23-8-44	90	70
P30=CM6-29-18-32	100	70
P31=CM11-23-8-53	100	100
P32=CM14-37-7-19	90	70
P33=CM13-8-12-35	100	100
P34=CM14-37-7-18	100	100
P35=CM11-23-8-76	100	100

8. 저 phytate 계통의 유지 및 증식

가. 영덕벼

영덕벼의 저 phytate 계통은 현재의 단계에서 3개체만(KM20-1-13-7, KM20-6-5-4 및 KM20-13-1-2)을 대상으로 계통의 유지 및 증식을 실시하고 있으나, 이들은 전반적으로 생육에 부진함을 보였다. 이들중 KM20-13-1-2의 경우는 특히 생육상태가 저조하여 종자를 얻을 수 없었으며, 월동중에 식물체를 생존시키고자 하는 시도가 번번히 실패하고 있다. 이와 같은 결과는 저 phytate 돌연변이체의 특이성으로도 여겨지고, 돌연변이체 생육전반과 영덕벼의 재배·생리적인 장애가 첨가된 것으로 보여진다. 나머지 2개의 계통은 다소 생육이 안정적으

로 종자를 얻을 수 있었다.

나. 일품벼

일품벼의 경우는 선발된 계통이 5계통으로 CM5-24-19, CM6-29-18, CM11-23-8, CM13-8-12, CM14-37-7 등이었다. 이들 5계통에 대하여 세부적인 계통선발을 위하여 각 계통별로 34, 36, 78, 60, 21씩의 M₂종자에 대하여 다시 산분해 비산법의 발색 반응실험을 실시하여 48개에 개체를 선발할 수 있었다. 이들 48개의 개체는 저 phytate산 함유의 비율은 50%, 70%, 90%로 저하되는 경향을 보였다. 산분해 비산법의 발색반응실험을 하고 남은 반쪽의 부분(배를 포함한 부분)은 hormone free의 MS배지에 과종하여 생육시킨 후 순화처리용 pot에 이식하여 생육시킨 다음 본답으로 정식 이양하여 재배 하였다. 과종으로부터 본답에 이양하는 과정에 저 phytate산 함유 돌연변이체의 경우 일부 개체에서 embryo death 현상과 albino 현상이 발생하여 총 48개체중 38개체만이 생존하였다. 이들은 본답의 생육과정에서도 3개체가 생존하지 못하여 결국 35개체만의 계통을 유지할 수 있었다.

일품벼에서 얻어진 35계통의 M₂세대 돌연변이체는 M₃세대에서 288계통으로 증식되었다. 현재 유지되고 있는 것은 M₂세대(35계통)을 기초로 하여 M₃세대에서 각각 1계통씩 선발하여 총 35계통을 강원대학교 부속농장의 하우스 포장에서 유지하고 있으며, 10월 초순에 수확 및 돌연변이주를 확보하여 월동을 준비하고 있다.(표 15) 대량증식은 옥수수의 저 phytate 함유 돌연변이체에서도 나타나는 결과와 같은 발아에 이상을 보이는 현상이 본 실험에서도 동일하게 나타나서 M₂ 및 M₃세대 전체의 증식은 한계가 있었다. 따라서 본 실험에서는 M₂세대를 기초로한 8계통의 M₃세대 58계통을 강원대학교 부속농장의 본답포장에서 증식하였으며, 10월 24일에 58계통에 대하여 각각 수확 하였다.(표 16)

표 15. 유지중에 있는 M₃ 저 phytate 돌연변이 계통

P1=CM13-8-12-14-9
P2=CM11-23-8-10-2
P3=CM11-23-8-42-1
P4=CM6-29-18-19-1
P5=CM13-8-12-6-7

P6=CM11-23-8-5-7
 P7=CM13-8-12-17-1
 P8=CM6-29-18-6-1
 P9=CM11-23-8-1-1
 P10=CM6-29-18-33-2
 P11=CM11-23-8-63-1
 P12=CM11-23-8-36-1
 P13=CM11-23-8-17-1
 P14=CM11-23-8-69-1
 P15=CM11-23-8-13-7
 P16=CM11-23-8-64-6
 P17=CM13-8-12-26-1
 P18=CM13-8-12-60-1
 P19=CM6-29-18-28-1
 P20=CM11-23-8-21-1
 P21=CM11-23-8-32-10
 P22=CM11-23-8-34-4
 P23=CM11-23-8-25-1
 P24=CM11-23-8-7-7
 P25=CM14-37-7-17-7
 P26=CM13-8-12-12-1
 P27=CM5-24-19-14-5
 P28=CM14-37-7-20-1
 P29=CM11-23-8-44-1
 P30=CM6-29-18-32-3
 P31=CM11-23-8-53-3
 P32=CM14-37-7-19-1
 P33=CM13-8-12-35-2
 P34=CM14-37-7-18-6
 P35=CM11-23-8-76-1

총 35계통

표 16. 증식중에 있는 M3 저 phytate 돌연변이 계통

P1=CM13-8-12-14-1~9
 P2=CM11-23-8-10-1~2
 P5=CM13-8-12-6-1~7
 P7=CM13-8-12-17-1~10
 P17=CM13-8-12-26-1~6
 P18=CM13-8-12-60-1~8
 P27=CM5-24-19-14-1~6
 P34=CM14-37-7-18-1~10

총 58계통

9. 돌연변이 계통들의 유전분석

가. 돌연변이체들의 재배 및 농업형질 조사

돌연변이체의 재배 및 농업형질에 대한 조사는 돌연변이체 재배에서 본포장에서의 재배, 소단위 하우스형 재배, pot을 이용한 재배, 월동기간중의 재배 및 기타 재배 등 여러 가지의 재배양식을 이용하여 재배를 실시한 바 각각의 재배양식은 다양한 돌연변이체를 선발 및 유

지하는데 적절히 이용되었다고 사료된다. 각 재배양식에 있어서 장·단점은 있으나 서로의 재배양식을 상호보완함으로 각 항목의 농업형질을 조사하는데 효율적인 결과를 가져왔다. 때문에 본 실험과 같이 돌연변이원의 처리에 의한 다양한 돌연변이체를 선발하고 재배하는데는 더욱 다양한 재배양식의 개발이 필요하다고 여겨 진다. 특히 월동기간의 소면적에 대량의 돌연변이체를 보존하기 위한 재배양식의 개발은 그 필요성이 적실한 사정에 있다.

저 phytate산을 함유하는 돌연변이체는 생육상에 정상의 것과 비교하여 다소 생육의 부진함과 불필요한 성장(도장)을 보이는 것으로 보아 아직 유전적으로 고정되어 있지 않은 것으로 보여짐으로 고정에 필요한 재배양식도 강구되어야 할 것으로 사료된다. 고정 후 이들 돌연변이체에 대한 대량 증식의 차원에서도 재배면적을 대량으로 요구하게 됨으로 이들 돌연변이 계통에 대한 본답포장의 확보와 숙기 조절을 통한 기계화에 따른 재배양식도 요구된다.

농업형질에 대한 조사는 각종 돌연변이체의 특성을 파악하고 기존의 품종과의 비교에 이용되는 것으로 중요하고 특히, 선발된 돌연변이의 재배 및 생육에 특성을 이해하는데 필요한 자료이다. 이와 같은 농업형질에 따라 진정으로 재배양산 체계를 결정하는 지표로 사용된다. 각 조사항목은 다음과 같으며, 그에 따른 저 phytate산 함유의 돌연변이체들의 결과를 요약하였다.(표 17)

표 17. 유지종인 M3 돌연변이체의 농업형질조사 결과(과중일<5.10>, 이양일<6.10>)

계통명	출수시 (일)	출수기 (일)	수전기 (일)	성숙기 (일)	초장 (cm)	간장 (cm)	수장 (cm)	분열경수 (개)	수수 (개)
P1-CM13-8-12-14-9	8.25	8.28	8.31	9.30	81.2	58.6	23.8	11.8	16.0
P2-CM11-23-8-10-2	8.24	8.27	8.30	9.29	87.1	56.4	20.0	12.4	14.4
P3-CM11-23-8-42-1	8.25	8.28	8.31	9.30	83.3	45.0	18.0	16.0	19.3
P4-CM6-29-18-19-1	8.25	8.28	8.31	9.30	81.7	45.6	17.6	17.4	16.6
P5-CM13-8-12-6-7	8.22	8.25	8.28	9.27	85.0	64.2	22.4	15.9	15.0
P6-CM11-23-8-5-7	8.25	8.28	8.31	9.30	91.1	62.2	21.4	14.5	13.4
P7-CM13-8-12-17-1	8.24	8.27	8.30	9.29	86.6	62.4	23.0	15.0	10.6
P8-CM6-29-18-6-1	8.24	8.27	8.30	9.29	89.2	64.2	21.0	14.7	16.8
P9-CM11-23-8-1-1	8.27	8.30	9.2	10.1	90.8	65.0	21.6	15.2	17.4
P10-CM6-29-18-33-2	8.27	8.30	9.2	10.1	82.4	50.6	18.8	15.8	17.6
P11-CM11-23-8-63-1	8.29	9.1	9.4	10.3	92.0	61.4	21.2	14.4	15.0
P12-CM11-23-8-36-1	8.29	9.1	9.4	10.3	93.0	61.8	19.2	13.2	10.8
P13-CM11-23-8-17-1	8.29	9.1	9.4	10.3	92.2	63.2	21.0	17.6	14.4

P14=CM11-23-8-69-1	8.27	8.30	9.2	10.1	93.2	67.6	21.0	16.1	14.6
P15=CM11-23-8-13-7	8.27	8.30	9.2	10.1	83.4	62.0	20.8	16.1	11.2
P16=CM11-23-8-64-6	8.27	8.30	9.2	10.1	94.7	64.2	20.8	18.0	13.2
P17=CM13-8-12-26-1	8.24	8.27	8.30	9.29	87.7	72.0	22.8	14.5	17.0
P18=CM13-8-12-60-1	8.24	8.27	8.30	9.29	90.1	70.0	22.2	13.6	13.6
P19=CM6-29-18-28-1	8.25	8.28	8.31	9.30	84.5	56.2	19.8	13.8	14.0
P20=CM11-23-8-21-1	8.25	8.28	8.31	9.30	92.7	59.8	20.2	14.9	14.6
P21=CM11-23-8-32-10	8.27	8.30	9.2	10.1	92.6	68.2	20.8	15.8	14.6
P22=CM11-23-8-34-4	8.24	8.27	8.30	9.29	91.6	59.8	20.2	16.1	17.0
P23=CM11-23-8-25-1	8.24	8.27	8.30	9.29	88.6	55.2	19.8	11.8	9.8
P24=CM11-23-8-7-7	8.25	8.28	8.31	9.30	92.8	58.6	20.2	16.1	12.4
P25=CM14-37-7-17-7	8.25	8.28	8.31	9.30	92.8	61.8	22.2	17.6	17.0
P26=CM13-8-12-12-1	8.24	8.27	8.30	9.29	87.6	54.6	21.2	15.3	14.8
P27=CM5-24-19-14-5	8.31	9.3	9.3	10.2	75.3	47.2	21.8	12.1	19.4
P28=CM14-37-7-20-1	8.27	8.30	9.2	10.1	84.4	60.6	21.8	15.5	18.6
P29=CM11-23-8-44-1	8.27	8.30	9.2	10.1	89.4	61.4	21.2	18.6	18.0
P30=CM6-29-18-32-3	8.27	8.30	9.2	10.1	81.8	53.0	21.0	18.9	24.8
P31=CM11-23-8-53-3	8.27	8.30	9.2	10.1	88.7	63.4	20.6	21.5	23.6
P32=CM14-37-7-19-1	8.27	8.30	9.2	10.1	87.5	53.6	20.8	17.5	16.0
P33=CM13-8-12-35-2	8.29	9.1	9.4	10.3	81.2	58.4	21.8	14.5	14.6
P34=CM14-37-7-18-6	8.27	8.30	9.2	10.1	80.9	59.2	23.0	14.7	17.4
P35=CM11-23-8-76-1	8.27	8.30	9.2	10.1	78.1	57.2	21.0	14.7	17.0
Yeongdeogbyeo	8.20	8.24	8.28	9.27	96.2	71.0	22.6	16.3	12.4
Upumbyeo	8.25	8.28	8.31	9.30	98.3	69.0	22.2	20.5	12.6

총 35계통

10. 저 phytate 계통의 증식

저 phytate 계통의 증식은 288개의 계통을 전부 파종하였으나 이들중 8개 (P1=CM13-8-12-14, P2=CM11-23-8-10, P5=CM13-8-12-6, P7=CM13-8-12-17, P17=CM13-8-12-26, P18=CM13-8-12-60, P27=CM5-24-19-14, P34=CM14-37-7-18)의 계통을 제외한 나머지 27개의 계통은 이미 옥수수의 저 phytate 돌연변이체에서도 보고된 바와 같이 발아에 이상을 보이는 관계로 일차적으로 M₃세대의 각 계통에서 1계통(표 17)씩 총 35계통을 선발하여 배유를 제거하고 hormone free의 MS배지에서 발아를 시킨 후, 순화과정을 거쳐서 직접 강원대학교 부속농장 하우스 포장에 이식하여 계통을 유지하고 있으며, 이들 계통은 수확과 동시에 주보존을 통한 월동을 실시하고 있다.

또한, 증식은 위에서 언급한 8개의 계통에서 분리된 58개의 계통(표 16)을 위주로 하여 강원대학교 부속농장의 본포장에 1,000여평에 손이양하여 생육을 시켰으며, 10월 24일 58계통에 대하여 각각 수확하여 고추건조기를 이용 평균 45℃를 유지하며 3일간 건조시켜 보관중에 있다.

표 18. 일품벼에서 유기된 M₂종자 35계통에 대한 phytate산 함유의 결과

돌연변이 계통명	증자의 반복수									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P1=CM13-8-12-14	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-
P2=CM11-23-8-10	***	***	***	-	***	***	***	**	***	**
P3=CM11-23-8-42	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P4=CM6-29-18-19	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***
P5=CM13-8-12-6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P6=CM11-23-8-5	***	**	**	***	*	***	***	**	**	**
P7=CM13-8-12-17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P8=CM6-29-18-6	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P9=CM11-23-8-1	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P10=CM6-29-18-33	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***
P11=CM11-23-8-63	***	***	***	***	**	**	***	***	***	***
P12=CM11-23-8-36	***	**	**	**	**	***	***	*	**	**
P13=CM11-23-8-17	***	***	***	***	***	***	***	**	**	**
P14=CM11-23-8-69	**	**	**	*	-	**	**	**	**	**
P15=CM11-23-8-13	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P16=CM11-23-8-64	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***
P17=CM13-8-12-26	**	*	**	**	**	**	*	*	**	**
P18=CM13-8-12-60	*	*	**	*	*	**	**	*	**	*
P19=CM6-29-18-28	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P20=CM11-23-8-21	***	***	**	***	**	**	**	***	**	**
P21=CM11-23-8-32	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P22=CM11-23-8-34	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P23=CM11-23-8-25	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P24=CM11-23-8-7	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***
P25=CM14-37-7-17	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P26=CM13-8-12-12	***	**	**	**	***	***	**	**	**	**
P27=CM5-24-19-14	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P28=CM14-37-7-20	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P29=CM11-23-8-44	*	**	***	**	**	**	**	**	**	*
P30=CM6-29-18-32	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P31=CM11-23-8-53	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P32=CM14-37-7-19	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P33=CM13-8-12-35	*	**	*	**	**	***	**	**	**	*
P34=CM14-37-7-18	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
P35=CM11-23-8-76	**	**	***	**	**	**	**	***	**	***
Ilpumbyeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 감소의 경향이 보이지 않음
 * 50% 감소의 경향
 ** 70% 감소의 경향
 *** 90% 감소의 경향

제 4 절 고 찰

1. MNC처리 및 돌연변이 선발 조건 규명

처리대상은 무처리한 것과 벼가 중복수정이 이루어졌다고 여겨지는 시기로 처리 당일 12 시경에 개화한 것을 기준으로 하여 8시간이 경과한 것에서부터 1시간 간격으로 실시하여 15 단계를 두었다. 저 phytate산의 돌연변이를 보이는 시간대는 수분 후 12·13·18·20·21시간이 경과한 것에서 많이 얻어졌다.

처리에 따른 내부온도로 처리장소의 온도와 처리액의 온도는 전자가 25~29℃의 범위이며, 후자는 26~27℃의 범위가 적당한 것으로 여겨진다.

처리장소의 광조건은 가능하면 달빛마저도 없는 그믐 밤이 좋으나 그 것은 처리 형편상 가능한 경우에만 실시하고, 되도록이면 빛에 노출되지 않도록 하였으며, 처리시에 작업의 편의상 붉은색의 등은 일시적으로 사용하였다.

처리액의 농도는 1mM을 기준으로 이 보다 고농도와 저농도의 수준으로 실시하였으나, 실질적으로 고농도의 경우는 처리대상이 생존하는 효율이 떨어졌으며, 이와는 반대로 저농도에서는 돌연변이의 발생빈도가 떨어지는 결과를 얻었다. 그러므로 벼의 수정란에 MNU의 처리 농도는 1mM이 가장 효율적인 것으로 여겨진다.

처리액의 pH는 처음부터 4.8~5.0에 고정하였으나 기본적으로 4.8의 경우가 가장 효율적인 것으로 보고되고 있다.

처리시간은 처리농도와 비슷한 결과를 가져오는 것으로 너무 길거나 짧은 경우는 그에 따른 장애와 비효율성을 보이는 것으로 긴 경우는 벼의 생리적 장애와 돌연변이원인 MNU의 약해를 입어서 치사하는 경우가 초래되며, 짧은 경우는 돌연변이의 발생 빈도가 줄어드는 경향을 보이게 된다. 따라서 본 실험의 결과에서는 45~50분의 처리가 효율적인 돌연변이의 유발 효과를 보이는 것을 알수 있었다.

처리 후 수세의 경우는 흐르는 물에서 충분히 수세하여야 하는데 이때 수세의 시간이 장시간의 경우는 처리시간에서와 같이 벼의 생리적 장애를 초래하고 단시간 수세의 경우는 처리액이 그대로 남아 있어서 수세의 효과를 얻을 수 없다는 결론이다. 또한 이때의 수온의 경우는 벼의 생육에 저해(저온장애)를 줄 수 있으므로 중요하며 적절한 수온은 19℃ 정도 내외인 것으로 여겨진다.

2. 돌연변이체의 선발

일품벼에 있어서는 그 생육이 전반적으로 양호하고 일부의 계통에서는 강원대학교 부속농장의 관행재배법에 부합되지 않는 것으로 여겨지는데 영양결핍증상과 유사한 반응을 보였으나, 수량적인 면에서는 크게 뒤떨어지지 않았다.

돌연변이의 선발은 그 계통의 선발에 있어서 최초의 선택이 중요하다. 농업적 형질의 파악과 이용의 측면에서 중요하고, 재배·생육상의 측면에서도 중요하다. 이는 결국 연구의 목적을 달성함에 있어서 재료가 항상 유지되어야 하고, 정확한 계통의 유지에 무리함이 없어야 하기 때문이다. 또한, 설정된 연구에 각 과제별의 협력을 필요로 하는데, 특히 저 phytate산 함유 돌연변이의 경우는 그 함유량의 조사가 선발된 개체를 가급적 빠른 시간내에 분석되어야 다음의 세대로 진전시키는데 유효하다.

다음으로는 돌연변이체가 생육환이 길기 때문에 어려움이 많으며, 겨울철의 월동에 있어서 선발된 각각의 돌연변이체를 pot별로 유지하여야 한다는 어려움이 있다. 춘천지방의 경우 겨울철의 기온이 급하강하고 일조의 조건도 양호한 편이 아니기 때문에 유지의 어려움이 가중된다.

3. 돌연변이체들의 재배 및 농업형질 조사

돌연변이체의 재배 및 농업형질에 대한 조사는 돌연변이체 재배에서 본포장에서의 재배, 소단위 하우스형 재배, pot을 이용한 재배, 월동기간중의 재배 및 기타 재배 등 5가지의 재배양식을 이용하여 재배를 실시한 바 각각의 재배양식은 다양한 돌연변이체를 선발 및 유지하는데 적절히 이용되었다고 사료된다. 각 재배양식에 있어서 장·단점은 있으나 서로의 재배양식을 상호보완함으로써 각 항목의 농업형질을 조사하는데 효율적인 결과를 가져왔다. 때문에 본 실험과 같이 돌연변이원의 처리에 의한 다양한 돌연변이체를 선발하고 재배하는데는 더욱 다양한 재배양식의 개발이 필요하다고 여겨진다. 특히 월동기간의 소면적에 대량의 돌연변이체를 보존하기 위한 재배양식의 개발은 그 필요성이 적실한 사정에 있다.

저 phytate산을 함유하는 돌연변이체는 생육상에 정상의 것과 비교하여 다소 생육의 부진함과 불필요한 생장(도장)을 보이는 것으로 보아 아직 유전적으로 고정되어 있지 않은 것으로

로 보여짐으로 고정에 필요한 재배양식도 간구되어야 할 것으로 사료된다. 고정 후 이들 돌연변이체에 대한 대량 증식의 차원에서도 재배면적을 대량으로 요구하게 됨으로 이들 돌연변이 계통에 대한 본답포장의 확보와 숙기 조절을 통한 기계화에 따른 재배양식도 요구된다.

4. Phytate저함량 계통선발 및 유전분석

선발된 돌연변이체의 경우 영덕벼에서 2계통 일품벼에서 38계통이 확보되었다. 하지만, 영덕벼의 경우는 누차 제시한바 있지만 생육 및 육성의 특성상 그 재배에서 지리적으로 한계가 있는 것으로 판명되어 생육이 부진함을 보였다. 때문에 유지의 차원에서 2개의 계통이 선발되었다.

반면에 일품벼의 경우는 생육이 양호하고 재배에서도 별다른 문제점이 도출되지 않아 38개의 계통을 얻을 수 있었다. 하지만, 이 일품벼의 경우도 일부 3개의 계통은 생육에 장애를 보여 종자 얻을 수 없었으며, 결국 치사되는 결과를 가져왔다. 반면 35개의 계통은 그 생육이 양호하고 재배에도 용이하여 종자의 수확이 있었다.

유전력 분석의 경우는 다음의 저 phytate산 함유 돌연변이체의 교배의 결과를 통해서 알 수 있듯이 현재 보유하고 있는 35계통간 전부의 교배가 실시된다면 612개 정도의 교배 조합이 생겨서 좋은 결과를 보일 것으로 사료되나 현재 보유중인 돌연변이체들의 생육상태와 교배의 시기를 고려하여 불 때 년차적인 교배가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

5. 저 phytate 계통선발

일품벼에서 유기된 돌연변이체 M₂세대의 35계통에서 종자 350개를 이용하여 발색반응의 결과 1개의 계통 P1=CM13-8-12-14의 경우는 대부분이 정상으로 회복된 결과를 보였으며, 이들의 경우는 최초 선발에서는 저 phytate산을 함유하는 것으로 나타났으나 세대가 진전됨에 따라 원래의 정상으로 회복함에 따라 아직 유전적으로 고정이 되지않았음으로 사료된다.

M₃세대 288개체의 종자를 5개씩을 이용하여 M₂에서와 같은 발색반응의 실험에서도 똑같은 양상으로 결과가 나타났다. M₂세대에서 phytate산의 함유량에 변화가 없이 정상의 수치로 회복하는 1개의 계통 P1=CM13-8-12-14는 45개의 종자중 14개의 종자에서만 phytate산의 함유량이 떨어짐을 보였다. 반면에 나머지 계통에서는 고정의 효과인지는 아직 확실치 않으나

모두 떨어짐을 보였다.

6. 돌연변이 계통간의 교배

돌연변이체들의 상호 유전력 검정을 위하여 교배를 실시하였으며, 이에 따른 F₁종자들의 phytate산 형성을 추위를 조사할 수 있었다. F₁종자들의 생산을 위해서 실시된 교배의 경우, 영덕벼의 저 phytate산 함유 돌연변이체가 2개로 간단 하였으나 성과는 기대에 미치지 못하였다. 이유는 일부 영덕벼에 따른 돌연변이체의 경우 화분형성에 이상을 보이는 것이 있었다. 때문에 생육에 어려움과 더불어 화분의 형성의 어려움이 중복적으로 겹쳐서 교배의 성과는 매우 미진한 것으로 각 조합에서 얻어진 F₁종자는 23개에 불과 하였다.

일품벼의 경우는 전체적으로 200여개의 교배조합을 얻을 수 있었으며, F₁종자의 경우는 교배조합의 불화합에 의하여 다소간의 차이는 있으나 좋은 결과를 얻었다고 평가된다. 특히 일품벼의 경우는 전체적으로 돌연변이체의 출수기가 일정하고, 돌연변이체의 생육도 양호하여 좋은 결과를 가져온 것으로 여겨진다. 성숙기에 있어서 과습으로 다소 어려움은 있었지만 비교적 좋은 생육상태로 인하여 F₁종자의 결실이 좋았다. 얻어진 F₁종자는 산분해 비색법의 발색반응에 의하여 유전자군의 연관관계를 조사할 수 있었으며, 이들 F₁종자간의 상호작용을 알아보기 위하여 원품종에 대한 backcross 및 돌연변이체간 phytate산 함유의 정도를 시급히 조사하여서 F₂의 종자를 생산하였다. F₂의 종자는 각각의 조합에서 결실이 작은 관계로 과종기에 맞추어 분석할 필요성이 요구됨으로 아직 산분해 비색법의 발색반응 실험이 끝나지 않은 상태이다.

7. 돌연변이체의 재배 및 평가

저 phytate산 함유 돌연변이체의 재배와 그 돌연변이체에 대한 유전자원으로서의 평가는 각각의 돌연변이체에 대하여 특성을 평가하여 종자은행식으로 전산시스템으로 관리할 필요성이 있으며, 유전자원으로서 보존방법에 있어서도 돌연변이체의 유형별 보존, 종자저장법, 영양체보존법, 종자의 초저온 보존법등을 고려하여 구체적인 보존의 필요성이 요구된다. 실험의 결과가 좋다고 하여도 그 결실인 종자의 보존에 문제가 있다면 그간의 노력은 무산될 가능성이 높기 때문이다.

제 5 절 참고문헌

1. Enevoldsen B.S. and B.O. Juliano (1988) Ratio of A chains to B chains in rice amylopectins. *Cereal Chem.* 65:424-427.
2. Hamaker B.R. and V.K. Griffin (1990) Changing the viscoelastic properties of cooked rice through protein disruption. *Cereal Chem.* 67:261-264.
3. Hibi Y., S. Kitamura and T. Kuge (1990) Effect of lipids on the retrogradation of cooked rice. *Cereal Chem.* 67:7-10.
4. Hong S.K. and Y. Nagato (1994) How is embryogenesis genetically regulated? *The Tissue Culture* 20:163-167.
5. Hong S.K., H. Kitano, H. Satoh and Y. Nagato (1994) Rice embryogenesis is completed complicated interactions of many genes. *SABRAO & WSAA* 153-157.
6. Hong S.K., T. Aoki, H. Kitano, H. Satoh and Y. Nagato (1995) Temperature-sensitive mutation, *embryoless 1*, affects both embryo and endosperm development in rice. *Plant Science* 108:165-172.
7. Hong S.K., T. Aoki, H. Kitano, H. Satoh and Y. Nagato (1995) Phenotypic diversity of 188 rice embryo mutants. *Developmental Genetics* 16:298-310.
8. Hong S.K., H. Kitano, H. Satoh and Y. Nagato (1996) Mutations affecting embryo size in rice. *Rice Genetics Newsletter* 12:196-199.
9. Hong S.K., H. Kitano, H. Satoh and Y. Nagato (1996) How is embryo size genetically regulated in rice? *Development* 122:2051-2058.
10. Hong S.K. and N.S. Kim (1997) Genes associated with embryogenesis. *Molecular*

Biology News 9:29-37.

11. Hong S.K., S.Y. Lee, Y.B. Shin, K.M. Yoon and N.S. Kim (1998) Homeobox gene (*OSHI*) expression in embryonic mutants in rice (*Oryza sativa* L.). Korean J. of Biological Science 2:1-7.
12. Hong S.K. and N.S. Kim (1998) Mutational analysis of early embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). Proceeding of Apomixis (in press)
13. Jayabalan, N. and G.R. Rao (1987) Effect of MNU and EMS on chromosomal behaviour of *Lycopersicon esculantum* Mill. during meiosis. Cytologia 52:813-819.
14. Kazutoshi, O. and H. Fuwa (1983) A new mutant gene lowering amylose content in endosperm starch of rice, *Oryza sativa* L. Japan. J. Breed. 33:387-394.
15. Khush, G.S., C.M. Paule and N.M. De la Cruz (1979) Rice grain quality evaluation and improvement at IRRI. Chemical aspects of rice grain quality:21-31. IRRI, Los Banos, Philippines.
16. Kim, K.H., S.Z. Park, H.J. Koh and M.H. Heu (1992) New mutants for endosperm and embryo charaters in rice: Two dull endosperms and giant embryo. The SABRAO international symposium on the impact of biological research on agricultural productivity:125-131. SABRAO.
17. Kunio, K., N. Kurata, H. Satoh and T. Omura (1983) genetic control of meiosis in rice. I. Classification of meiosis mutants induced by MNU and their cytogenetical characteristics. Japan. J. Genet. 58:231-240.
18. Masahiro, Y., Y. Isono, H. Satoh and T. Omura (1984) Gene analysis of Sugary and Shrunken mutants of rice, *Oryza sativa* L. Japan. J. Breed. 34:43-49.
19. Sato Y., S.K. Hong, A. Tagiri, H. Kitano, N. Yamamoto, Y. Nagato and M. Matsuoka (1996) A rice homeobox gene, *OSHI*, is expressed before organ differentiation in a specific region during early embryogenesis. Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 93:8117-8122.

20. Satoh, H. and T. Omura (1975) Induction of mutation by treatment of fertilized egg cell with N-methyl-N-nitrosourea in rice. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 24:165-174.
21. Satoh, H. and T. Omura (1981) New endosperm mutations induced by chemical mutagens in rice, *Oryza sativa* L. Japan. J. Breed. 31:316-326.
22. Sano, Y., M. Katsumata and K. Okuno (1986) Genetic studies of speciation in cultivated rice. 5. Inter- and intraspecific differentiation in the waxy gene expression of rice. Euphytica. 35:1-9.
23. Tetsuro, M. and T. Shibuya (1983) Genetic analysis of mutants in mice induced by N-ethyl-N-nitrosourea. Japan. J. Genet. 58:263-267.
24. Yamaguchi, H (1962) The chimera formation in an X panicle after irradiation of dormant rice seed. Radiation Botany 2:71-77.
25. Yamaguchi, H (1972) The production of mutations by ionizing radiations and chemical reagent in relation to the duplication of chromosomes. Gamma Field Symp. 11:29-42.
26. Yasuaki, T., H. Kitano, H. Satoh and Y. Nagato (1992) A gene profoundly affecting shoot organization in the early phase of rice development. Plant Science 82:91-99.
27. Yano, M., K. Okuno, J. Kawakami, H. Satoh and T. Omura (1985) High amylose mutants of rice, *Oryza sativa* L. Theor. Appl. Genet. 69:253-257.
28. Yano, M., K. Okuno, H. Satoh and T. Omura (1988) Chromosomal location of genes conditioning low amylose of endosperm starch in rice, *Oryza sativa* L. Thero. Appl. Genet. 76:183-189.

제 5 장 Low Phytate Rice 육종을 위한 분자 유전학적 연구

제 1 절 서 설

피틴산은 종자발달 과정중 인의 주요한 저장형태로서 종자가 발아시나 성숙시에 인의 metabolism에 중요한 영향을 끼친다. 또한 피틴은 생리학적으로 중요한 인과 결합하여 염의 형태인 phytate 형태로도 존재하므로 이들 이온들의 생리학적인 조절의 기능으로서도 아주 중요하다. 따라서 본 세부과제에서는 피틴산의 식물체 생체 내에서의 생 합성 과정에 연관된 유전자를 클로닝 하고자 실시하였다. 클로닝의 전략으로는 DD-RT RCR, mRNA-AFLP 기법을 이용하여 피틴산 합성에 관련된 유전자의 단편을 확보함과 동시에 작성된 cDNA library에 plaque hybridization을 수행해 각각의 단편의 전체염기서열을 확보함을 골자로 하였으며, 그 외에 *Aspergillus*의 phytase 유전자를 토대로 작성된 2개의 primer를 이용하여 일품벼의 genomic DNA로부터 증폭여부를 시험하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. RAPD 분석

95년도에 확보된 영덕벼의 저피틴산 돌연변이 식물체인 1-13-7, 1-13-2, 13-1-2, 13-1-4, 6-5-4를 초자온실에서 동계기간동안 재배하여 이들의 게놈 DNA를 추출하여 변이계통간의 유전적 차이를 PCR-RAPD법으로 분석하였다.

가. 실험방법

1) 식물재료

식물재료로는 냉조풍 적응성이 강한 경상남북도 해안지역 장려품종인 영덕벼의 수정란에 화학돌연변이 유발물질인 MNU를 처리하여 얻은 종실을 자식시킨 뒤 얻어진 종실중 피틴산 함량이 낮은 종자(M₂)를 선발하였다. 선발된 M₂종자는 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에

발아시킨 뒤 초자온실에서 동계기간동안 재배하였으며 이들중 피틴산 함유량이 가장 많이 떨어진 1-13-7을 본실험의 재료로 이용하였다. 다른 돌연변이 개체인 1-13-2, 1-13-4, 13-1-2, 6-5-4들도 피틴산 함량은 낮았지만 생육 및 임실률 등에서 원 품종인 영덕에 비해 변이정도가 심해 본 분석에는 이용하지 않았다.

2) DNA의 분리

DNA 추출은 영덕벼와 돌연변이 개체들 중 1-13-7을 초자온실에서 13주 경과한 성숙한 식물체를 재료로 이용하였다. 추출방법은 아래의 방법에 의거해 실시하였다.

식물체로부터 지름 1cm, 직경 5cm 정도의 엽절편(약 0.5g)을 1.5ml tube에 가위로 잘게 잘라 넣고 액체질소로 급냉 시킨 후 plastic 막대를 이용하여 고운 분말이 될 때까지 잘 갈아준다. 엽절편의 분말이 녹기전에 추출 buffer(200mM Tris-Cl, pH 8.0, 200mM NaCl, 25mM EDTA, pH 8.0, 0.5%SDS)를 750 μ l 넣고 부서진 분말과 잘 섞어준 다음 여기에 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 넣어 약 5분간 손으로 buffer와 완전히 포화되도록 잘 섞어주고 나서 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 보관한 뒤, 13,000rpm에서 15분간 원심분리 시켜주고 다시 상층액을 취해서 새 tube에 옮긴 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관해놓은 isopropanol을 동량 첨가하여, -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 보관하였다. 그리고, -20 $^{\circ}$ C에 보관한 상층액을 13,000rpm에서 15분간 원심분리하여 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 조심스럽게 세척하고 나서 침전된 DNA를 공기중에 충분히 건조시킨 다음 여기에 200 μ l의 RNase(10mg/ml)가 첨가된 TE buffer(10mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)를 넣고 녹인 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 정도 보관하여 함께 추출된 RNA를 제거하였다. 추출된 DNA는 0.8% agarose gel에서 농도가 알려진 lambda DNA를 기준으로 삼아 농도를 측정하였다.

3) PCR 증폭 및 gel 전기영동

PCR 증폭은 1X buffer(10mM Tris HCl, pH 8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% Triton X 100), 200 μ M dNTP(Promega), 0.5 μ M의 UBC RAPD Primer(10mer), 1 unit Taq DNA Polymerase(Dynazyme), 50ng의 벼 genomic DNA가 혼합된 25 μ l의 반응액에 20 μ l의 mineral oil(Sigma)을 첨가하여 PTC-100 thermocycler(MJ Research Inc.)에서 94 $^{\circ}$ C 초기 완

전변성을 시키기 위해 5분간 반응시킨 후, 94°C 1분, 35°C 1분, 72°C 2분을 1 cycle로 최종 45cycles을 반복한 다음 72°C에서 10분간 더 진행시킨 후 4°C에 보관하였다.

PCR 증폭 후 얻은 산물 5 μ l 와 6X loading dye 1 μ l를 혼합한 뒤 그중 1.5 μ l를 취하여 8% non-denaturing polyacrylamide gel에 loading하고 200V에서 3시간동안 전기영동 한 후 silver stain법을 이용하여 전개된 band들을 염색하였다. 염색이 끝난 gel은 gel dry용 필름을 이용해 1시간동안 dry시킨 뒤 장기보관 하였다.

2. Genomic DNA의 AFLP 분석

RAPD의 단점인 낮은 재현성 문제를 극복하기 위하여 Williams 와 Koebner 등은 genomic DNA를 제한효소로 절단한 후 증폭반응을 하면 증폭양상이 단순화되며 bands의 상대적인 강도가 변하여 재현성을 높이는 AFLP 방법을 개발하였다. AFLP는 RFLP의 정확성과 RAPD의 간편함을 각각 수용함과 동시에 문제점을 극복하기 위하여 제한효소를 이용하여 DNA를 절단한 후 adaptor에 상응하는 primer를 이용하여 RAPD와 같이 PCR을 이용하여 DNA단편을 증폭하여 marker를 얻을 수가 있는데 분석범위가 상당히 넓고, 각 반응마다 생성되는 단편들의 수는 약 50-100개 정도로서 이들은 각 개체간 변이가 아주 심하여 marker개발에 아주 유용하게 사용되고 있다. Pieter등은 AFLP가 어떤 새로운 기원의 식물체 DNA를 fingerprinting하는데 가장 강력한 도구라고 하였고, Lin등은 RFLP, RAPD, AFLP등을 대두의 유전분리 집단에 적용 분석한 결과 AFLP 방법이 가장 유용한 것으로 보고하였다.

일품벼로부터 유기된 돌연변이 개체들의 경우 low phytic acid 특성이 유전적으로 많이 고정되어있음을 알 수 있었지만 교배실험을 96년도 9월에 실시한 이유로 인해 당해에 DD-RT PCR을 수행하기 위한 재료를 얻을 수 없었다. 따라서 분석 면에서 가장 강력한 기법 중 하나인 AFLP분석법을 도입하여 일품벼와 2 group으로 나뉘어진 돌연변이 개체간에 DNA수준에서도 차이를 발견할 수 있는지 보기 위하여 수행하였다.

가. 실험 방법

1) Genomic DNA의 분리

일품벼와 A group에서 선발된 P21, P27, B group에서 선발된 P23 그리고 일품벼에 대한

각각의 역 교배로부터 얻은 5개체의 genomic DNA를 기존의 추출방법을 약간 변형하여 사용하였다. 식물체로부터 지름 1cm, 직경 5cm 정도의 엽 절편(약 0.5g)을 1.5ml tube에 가위로 잘게 잘라 넣고 액체질소로 급냉 시킨 후 plastic 막대를 이용하여 고운 분말이 될 때까지 잘 갈아준다. 엽절편의 분말이 녹기 전에 추출 buffer(200mM Tris-Cl, pH 8.0, 200mM NaCl, 25mM EDTA, pH 8.0, 0.5%SDS)를 750 μ l 넣고 부서진 분말과 잘 섞어준 후 여기에 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 넣어 약 5분간 손으로 buffer와 완전히 포화되도록 잘 섞어주고 나서 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 보관한 뒤, 13,000rpm에서 15분간 원심분리 시켜준 후 상층액을 취해서 새 tube에 옮긴 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관해놓은 isopropanol을 동량 첨가한 후, -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 보관하였다. 그리고, -20 $^{\circ}$ C에 보관한 상층액을 13,000rpm에서 15분간 원심분리하여 침전시킨 후 70% ethanol로 조심스럽게 세척하고 나서 침전된 DNA를 공기중에 충분히 건조시킨 다음 여기에 200 μ l의 RNase(10mg/ml)가 첨가된 TE buffer(10mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)를 넣고 충분히 녹인 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 정도 보관하여 함께 추출된 RNA를 제거하였다. 추출된 DNA는 0.8% agarose gel에서 농도가 알려진 lambda DNA를 기준으로 삼아 농도를 측정하였다.

2) AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)

며 genomic DNA 1 μ g을 *EcoR* I(BRL) 5unit를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간동안 절단한 후 2.5배의 ethanol 을 첨가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 침전시킨 후 14,000rpm 에서 30분 동안 원심분리 하여 절단된 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 실온에서 충분히 말린 후 *Mse* I(Gibco)으로 DNA를 다시 절단하였으며, 전체 부피의 1/10의 10M ammonium acetate 와 2.5배의 ethanol 을 첨가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 침전시킨 후 14,000rpm 에서 30분 동안 원심분리 하여 절단된 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 멸균된 3차 증류수에 녹인 뒤 5unit의 T4 DNA ligase(Promega)와 0.5 μ M의 *EcoR* I/*Mse* I adaptor를 첨가한 후 14 $^{\circ}$ C에서 12시간 ligation 시켰다. Ligated DNA는 1:10으로 희석하여 pre-amplification을 하기 위한 재료로 사용하였다.

Pre-amplification은 adaptor에 상보적인 염기서열을 가진 primer를 이용하여 증폭시키는데,

이 과정을 통하여 제한효소로 절단된 DNA중 1/16만이 증폭되어진다. PCR 반응조건은 희석된 DNA 5 μ l에 1X buffer(10mM Tris-HCl, pH8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% Triton X 100), 200 μ M dNTP, 0.5 μ M EcoR I-0/Mse I-1 primer, lunit Taq DNA polymerase(Dynazyme)를 첨가하여 최종 50 μ l의 양으로 Perkin-Elmer thermal cycler에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분을 1cycle로 최종 20회 반복하고 반응을 종료하였다. Pre-amplification의 PCR 산물은 1 : 50으로 희석하여 2차 PCR 반응을 수행하기 위한 재료로 사용하였다. 2차 PCR 반응의 조건은 Pre-amplification으로부터 희석된 DNA 5 μ l에 1X buffer(10mM Tris-HCl, pH8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% Triton X 100), 200 μ M dNTP, 0.5 μ M EcoR I-2/Mse I-3 primer, lunit Taq DNA polymerase(Dynazyme)를 첨가하여 최초 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 65 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 첫cycle로 시작하여 다음 cycle 부터는 annealing 온도를 1 $^{\circ}$ C씩 감소시키면서 10cycle을 반복한 뒤 마지막으로 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 23회 반복하고 반응을 종료하였다.

최종 PCR 반응이 끝난후 PCR산물 6 μ l를 취하여 formamide loading dye(95% formamide, 10mM EDTA, pH8.0, 0.05% bromo phenol blue, 0.05% Xylene cyanol FF) 4 μ l와 혼합한 뒤 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 다음 그중 6 μ l를 55 $^{\circ}$ C로 미리 가열된 6% denaturing polyacrylamide gel [acrylamide:bisacrylamide(19:1) , 7.5M urea, 1X TBE(0.89M Tris-HCl, pH8.3, 0.89M boric acid, 0.02M EDTA, pH8.0)]에 loading한 후 1800V 80W에서 3시간동안 전기영동 한 다음 전개된 band들을 silver staining법으로 염색한 후 형광상자에서 결과를 분석하였다

3. DD-RT PCR 분석

RAPD 분석은 염기의 수가 9-12mer 정도의 짧은 short oligonucleotide primers를 이용하여 genomic DNA에 무작위로 배열되어있는 부위를 PCR로 증폭시킨 후 산물을 전기영동 상에서 관찰할 수 있는 방법이다. 이때 나타나는 다형화 현상은 genomic DNA에서 primer 증폭부위의 삽입(insertion), 결실(deletion) 등에 의해 나타나게 되는데, 이 방법은 아주 간편하고 빠른 시간 안에 분석 결과를 얻을 수 있어 많은 실험실에서 사용하고있는 방법이다. 분석의 간편성으로 인하여 이와 같은 RAPD는 F₁ 순도검정이나 병 저항성 유전자 마커 개발에

효율적으로 이용되고있으며, 식물 육종, 집단 유전학 등에 요구되는 sample screening에도 효과적으로 사용되고 있다. 그러나, 분석의 간편성은 있지만 재현성이 낮다는 단점 또한 지니고 있다.

최근 2-D, differential hybridization, subtractive hybridization 등 특정 유전자를 분리하기 위한 강력한 기술들이 개발되었다. 그러나 이러한 기법들은 기술적인 어려움 및 많은 양의 mRNA를 확보해야 한다는 단점을 가지고 있다. 따라서 본 실험의 궁극적인 목표인 피틴산 합성 및 합성에 관여하는 유전자를 cloning 하기 위하여, 개개의 여러 기법들의 제한성을 극복하고 유전자의 분리 속도를 높이기 위하여 개발된 differential display 기법을 본 실험에 도입하였다.

가. 실험방법

1) 식물재료

RAPD분석에 이용된 영덕 및 돌연변이 개체인 1-13-7을 96년도 봄에 초자온실에서 강원대학교 부속농장에 분주하여 증식시켰으며, 영덕과 1-13-7의 M₃ 종자의 배유를 재료로 사용하였다. 그리고 일품벼 또한 본 실험에 사용되었으며 영덕벼와 같은 MNU처리 과정을 통해 phytic acid 함량이 낮은 36개의 개체를 선발하였으며 이들 돌연변이 개체들의 M₃종자의 배유를 실험에 이용하였다. 일품벼로부터 유기된 돌연변이 개체들의 경우 돌연변이 개체들간의 상호교배 및 일품벼와의 역교배 분석을 시행한 결과 돌연변이 개체들간의 교배로부터 얻은 종자들에서는 low phytic acid의 특성이 유지되었으며 역교배로부터 얻은 종자들의 phytic acid 함량은 일품벼와 같은 수준으로 회복되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 일품벼로부터 유기된 돌연변이 개체들의 경우 low phytic acid의 특성이 유전적으로 많이 고정되었음을 알 수 있었다. 그리고 돌연변이 개체들간의 교배 자료를 분석한 결과 2개의 group(A 와 B)으로 나뉘어지는 것으로 보아 2개의 유전자가 phytic acid 합성에 관여하는 것으로 사료되어진다. 따라서 A group 에서 2개체(P21, P27) B group 에서 1개체(P23)를 선발하여 본 실험의 재료로 이용하였다.

2) RNA 분리

가) Total RNA의 분리

영덕벼, 일품벼 모두 개화 2주후 미숙배가 형성되었을 때 이삭을 채취하여 액체질소로 급냉시킨 후 -70°C 냉동고에 장기 보관하였다. Total RNA를 분리하기 직전에 종실을 액체질소에 다시 급냉시킨 후에 핀셋과 메스를 이용하여 종실이 녹기전에 종피를 제거하였으며, 이어 다시 종실의 호분층만을 채취하였다. 종실로 부터 분리된 호분층 1g을 액체질소하에 막자사발로 곱게 마쇄한 후 6ml의 denaturing solution(26mM sodium citrate, pH 4.0, 0.5% N-lauryl sarcosine, 0.125M β -mercaptoethanol, 4M guanidine thiocyanate ; Promega, RNAgent^(R) Total RNA Isolation System)이 담겨있는 50ml 원심분리 튜브에 넣고 마쇄된 분말이 buffer 상에서 녹을 수 있도록 잘 섞어주었다. 마쇄된 조직의 분말이 buffer에 완전히 포화된 것을 확인한 후 2M sodium acetate(pH 4.0) 600 μl 와 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1, pH 4.3-4.7) 6ml을 순차적으로 넣고 다시 섞어준 다음 얼음 상에서 10분간 방치하였으며, 10,000xg에서 20분간 원심분리하고 (4°C) 상층액을 새 원심분리 튜브에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 12시간 이상 -20°C 냉동고에 보관하였다. 보관된 상층액을 10,000xg에서 10분간 원심분리(4°C)하여 total RNA를 침전시켰으며, total RNA의 순도를 높이기 위하여 denaturing solution(26mM sodium citrate, pH 4.0, 0.5% N-lauryl sarcosine, 0.125M β -mercaptoethanol, 4M guanidine thiocyanate ; Promega, RNAgent^(R) Total RNA Isolation System) 5ml에 다시 녹인 후 isopropanol을 이용해 침전을 반복하였다. 최종적으로 침전된 total RNA는 75% ethanol을 500 μl 첨가하여 세척하고 실온에서 5분간 건조시킨 후 100 μl 의 DEPC(diethyl pyrocarbonate, Sigma)처리된 증류수에 충분히 녹인 후 사용하기 전 까지 -70°C 냉동고에 분주하여 보관하였다. 추출된 total RNA는 spectrophotometer를 이용해 농도 및 순도를 측정하였으며, 1% formaldehyde-agarose gel에 loading하여 60volt에서 3시간동안 전기영동 한 후 UV 투사기를 이용해 농도 및 순도를 확인하였다.

나) mRNA의 분리

일품벼의 경우 cDNA의 작성을 병행하기 위하여 total RNA가 아닌 mRNA만을 추출하여 DD-RT PCR 분석에 이용하였다. Total RNA 추출때와 같은 방법으로 준비된 호분층 1g을

막자사발로 고운 분말이 될 때까지 마쇄한 뒤 15ml의 lysis buffer[0.1M Tris buffer, 0.3M LiCl, 10mM EDTA, 1% lithium dodecylsulfate, 5mM DTT(dithiothreitol), pH 7.5]가 담겨있는 50ml 원심분리 튜브에 넣고 덩어리가 생기지 않게 잘 섞고 21gauge 주사바늘에 3회 통과 시킴으로 분쇄된 조직분말이 buffer에 완전히 포화 되도록 하고 나서 11,000xg에서 30초간 원심분리하여 세포잔유물 및 단백질을 침전시킨 후 상층액을 조심스럽게 새 튜브에 옮겼다. 옮겨진 상층액에 biotin으로 표지된 oligo(dT)₂₀ probe(100pmol/ μ l) 15 μ l를 첨가하여 잘 섞어준 뒤 lysis buffer[0.1M Tris buffer, 0.3M LiCl, 10mM EDTA, 1% lithium dodecylsulfate, 5mM DTT(dithiothreitol), pH 7.5]로 세척된 streptavidin magnetic particles(10mg/ml) 300 μ l를 넣고 침전물이 생기지 않게 다시 섞고나서 4°C에서 5분간 보관하였다. 그리고 magnetic separator를 이용해 lysis buffer[0.1M Tris buffer, 0.3M LiCl, 10mM EDTA, 1% lithium dodecylsulfate, 5mM DTT(dithiothreitol), pH 7.5]로부터 streptavidin magnetic particles을 분리하고 나서 washing buffer(10mM Tris buffer, 0.2M LiCl, 1mM EDTA, pH 7.5)로 세척 과정을 3회 반복하여 lysis buffer[0.1M Tris buffer, 0.3M LiCl, 10mM EDTA, 1% lithium dodecylsulfate, 5mM DTT(dithiothreitol), pH 7.5] 성분을 완전히 제거한 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate, Sigma) 처리된 증류수 50 μ l를 첨가하고 65°C에서 2분간 보관하여 streptavidin magnetic particles로부터 순수한 mRNA를 분리하였다. 추출된 mRNA는 spectrophotometer를 이용해 농도 및 순도를 측정하였으며, 1% formaldehyde-agarose gel에 loading하여 60volt에서 3시간동안 전기영동 한 후 UV 투사기를 이용해 농도 및 순도를 확인 하였다.

3) mRNA의 역전사 반응

추출한 RNA로부터 역전사 반응을 수행하기 앞서 DNase I 처리를 함으로서 genomic DNA의 오염을 제거하였으며, first strand DNA를 합성하기 위하여 total RNA 2 μ g(mRNA의 경우는 0.2 μ g)에 2.5 μ M의 oligo (dT) primer(T₁₁CA, T₁₂GC, T₁₁A, T₁₁CG), 20 μ M의 dNTP(Promega), 1X enzyme buffer(50mM Tris-HCl, 30mM KCl, 6mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, pH 8.3), 60unit의 M-MuLV(20unit/ μ l; BMS) 역전사효소를 첨가하여 최종 30

μl 의 양으로 37°C에서 1시간동안 반응시킨 다음 95°C에서 5분간 반응시킴으로서 역전사 효소를 불활성화 시켰다.

4) Differential display PCR 및 gel 전기영동

역전사 반응으로 부터 얻은 산물 중 $3\mu\text{l}$ 를 취하여 $2\mu\text{M}$ 의 dNTP, 1X buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5mM MgCl_2 , 50mM KCl, 0.1% Triton X 100), $2.5\mu\text{M}$ poly (dT) primer, $0.5\mu\text{M}$ random primer(20EA), 1unit Taq DNA polymerase(Dyanzyme)를 첨가한 뒤 Perkin-Elmer thermal cycler에서 최종 $10\mu\text{l}$ 의 양으로 94°C 30초, 40°C 1분, 72°C 30초를 1cycle로 최종 40회 반복하고 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시킨 후 종료하였다.

최종 PCR 반응이 끝난 후 산물에 9X formamide dye solution(30mM NaOH, 0.15% bromo phenol blue, 0.15% Xylene cyanol FF) $1.5\mu\text{l}$ 를 첨가하고 95°C에서 5분간 가열하여 증폭된 DNA를 완전 변성시킨 후 그중 $6.5\mu\text{l}$ 를 취하여 미리 가열된 6% denaturing polyacrylamide gel [acrylamide:bisacrylamide(19:1) , 7.5M urea, 1X TBE(0.89M Tris-HCl, pH8.3, 0.89M boric acid, 0.02M EDTA, pH8.0)]에 loading 하였다. 전기영동은 1800V, 80W에서 2시간동안 전개하였으며, 전개된 band들은 silver stain법을 이용해 염색한 후 light box 상에서 결과를 관찰하였다.

5) Polymorphic bands의 elution 및 reamplification

영덕벼와 들연변이 개체인 1-13-7, 6-5-4 그리고 일품벼와 P21을 비교해 한쪽에만 존재하거나, 명암도에서 상대적으로 더 짙게 보이는 band들을 선발하였으며, 선발된 band들은 gel 이 완전히 마른 후 메스를 이용해서 band가 위치한 부분을 잘라내어 각각 2개의 새 0.5ml PCR 튜브에 나누어 담았다. 각각의 절취된 band들은 특별한 elution 과정을 거치지 않고 gel 조각을 바로 재 증폭을 위한 재료로 사용하였다. 재 증폭을 위한 PCR 조건은 dNTP가 $20\mu\text{M}$ 을 사용했다는 점만 다를 뿐 differential display PCR을 위한 조건과 동일하게 수행하였다. PCR 반응이 끝난 후 1.5% agarose gel에 loading 하여 동일한 크기의 band가 증폭되었는지 확인하였다.

6) Polymorphic bands의 cloning

PCR 산물은 3' 끝에 단일염기 Adenine이 연장된다는 특징이 있다. 따라서 재 증폭한 band 들은 pGEM^(R)-5Zf(+) vector를 *EcoR* V로 절단한 뒤 3'양끝에 단일염기 thymidine을 확장시킨 pGEM^(R)-T Easy vector(Promega)를 이용해 cloning 하였다. Cloning된 vector는 표준적인 방법에 따라 숙주세포인 XL1-Blue에 형질전환 시킨 뒤 IPTG 와 X-gal 이 첨가된 LB 배지에서 white/blue 선발을 거쳐 외래 DNA가 삽입된 것으로 사료되는 colony(white)로부터 plasmid를 추출하였다. 추출된 plasmid는 0.8%의 agarose gel에 loading 하여 농도 및 순도를 확인하였으며 확인된 plasmid는 *EcoR* I 으로 절단한 뒤 1.5%의 agarose gel 에 다시 loading 하여 삽입된 DNA가 재 증폭한 band와 크기에 있어서 동일한지의 여부를 확인하였다.

7) Polymorphic bands의 sequencing

pGEM-T EASY vector의 경우 직접 sequencing이 가능한 plasmid이기 때문에 sub-cloning과정을 거치지 않고 삽입된 DNA가 확인될 경우 manual sequencing 방법 및 automated sequencer를 이용해 전체염기서열을 결정하였다.

가) Manual sequencing method

SILVER SEQUENCETM DNA sequencing system(Promega)을 이용하였으며, 5'에서 3'쪽으로 읽어 나갈 때의 PCR 수행조건은 2-4 μ g의 plasmid DNA에 4.5pmol의 pUC/M13 Forward Primer(5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'; 24mer), d/ddNTP Mixes (Deaza), DNA Sequencing 5X buffer(250mM Tris-HCl, pH9.0, 10mM MgCl₂), 1.25unit의 Taq DNA polymerase를 혼합한 뒤 최종 9 μ l의 양에 20 μ l의 mineral oil을 첨가하고 Perkin-Elmer thermal cycler에서 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 DNA를 완전변성 시킨 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 70 $^{\circ}$ C 30초를 1cycle로 전체 55회 반복하고 stop solution(10mM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) 3 μ l를 첨가하고 반응을 종료하였다. 역 방향(3'에서 5')을 읽을 경우 primer가 pUC/M13 reverse primer(5'TCACACAGGAAACA GCTATGAC3'; 22mer)로, PCR 반응조건에서 95 $^{\circ}$ C 30초, 42 $^{\circ}$ C 30초, 70 $^{\circ}$ C 1분을 55회 반복한다는 것만 다를 뿐 위의 방법과 동일하게 수행하였다. 반응이 종료된 후 PCR 산물을 95 $^{\circ}$ C에

서 3분간 완전변성 시키고, 미리 가열된 6% denaturing polyacrylamide gel에 2시간간격으로 순차적으로 loading하여 최종 6시간동안 전개한 후 silver staining 법을 이용해 band를 관찰하였다. Reading은 gel이 완전히 마른 뒤 형광상자에서 염기서열이 중복되는 부분을 찾아가며 전체염기서열을 결정하였다

나) Automated sequencing method

Cy5TM AutoCycleTM Sequencing Kit(Pharmacia Biotech)를 이용하였으며, 5'에서 3'쪽으로 읽어 나갈 때의 PCR 수행조건은 2 μ g의 plasmid DNA에 Cy5로 표지된 2.5pmol의 ALFred M13-40 Primer(5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'; 24mer) 3 μ l, reaction buffer 2 μ l, dNTP solution 5 μ l, DMSO(dimethyl sulfoxide) 2 μ l, 2.5unit의 Taq DNA polymerase를 혼합하여 최종 16 μ l의 양의 mixer를 만들고 각각의 ddNTP가 2 μ l씩 담겨있는 튜브에 4 μ l씩 분주하고 20 μ l의 mineral oil을 첨가한 다음 Perkin-Elmer thermal cycler에서 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 DNA를 완전변성 시킨 후 95 $^{\circ}$ C 36초, 65 $^{\circ}$ C 36초, 72 $^{\circ}$ C 84초를 1cycle로 전체 45회 반복하고 stop solution(deionized formamide/blue dextran) 4 μ l를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 역 방향(3'에서5')을 읽을 경우 primer가 ALFred M13 reverse primer (5'TCACACAGGAAACA GCTATGAC3'; 22mer)로, PCR 반응조건에서 95 $^{\circ}$ C 36초, 50 $^{\circ}$ C 36초, 70 $^{\circ}$ C 84초를 45회 반복한다는 것만 다를 뿐 위의 방법과 동일하게 수행하였다. 반응이 종료된 후 PCR 산물을 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 완전변성 시키고, automated sequencer에 4.5 μ l loading하여 최종 500분 동안 전개한 후 자동으로 저장된 자료를 검색하였다.

8) Northern hybridization 분석

Formaldehyde agarose gel을 만들기 위하여, 먼저 삼각플라스크에 0.5g의 agarose와 dH₂O 50ml을 넣고 agarose가 완전히 녹을 때까지 3회 정도 microwave로 끓여준다. 저울에 무게를 측정해서 증류수가 5ml 증발했을 때 20X MOPS buffer(400mM MOPS, 100mM sodium acetate, 20mM EDTA, pH 7.0) 2.5ml을 넣고 기포가 생기지 않게 잘 흔들어준 다음 온도가 60 $^{\circ}$ C정도 되었을 때 37% formaldehyde solution을 2.5ml넣고 다시 섞은 뒤 gel tray에 붓고 실온에서 30분 정도 굳힌다. 이때 30분을 초과하지 않도록 주의한다. 굳히는 동안 냉동고에서

추출된 RNA를 꺼내 얼음 상에서 녹인 뒤 RNA loading buffer(1X MOPS, 2.2M formaldehyde, 50% formamide)를 RNA양의 3배를 혼합하고, RNA를 완전변성 시키기 위하여 67°C에서 15분간 보관한 뒤 얼음 상에서 다시 15분간 보관하였다. Agarose gel에 RNA를(total RNA의 경우 30 μ g, mRNA의 경우 1.5 μ g) loading 한 뒤 1X MOPS buffer(20mM MOPS, 5mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.0)하에 60V에서 3시간동안 전기영동하고 UV 투사기에서 전개정도를 육안으로 관찰하였다. 전기영동이 끝난 gel은 formaldehyde 성분을 없애기 위하여 DEPC(diethyl pyrocarbonate, Sigma) 처리된 증류수로 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였으며, 세척이 끝난 gel은 0.05N NaOH 용액에 15-20분간 보관한 뒤 DEPC(diethyl pyrocarbonate, Sigma) 처리된 증류수로 5분간 다시 세척하고 20X SSC(0.3M Na₃citrate, 3M NaCl, pH7.0)용액에 30분 이상 보관하였다. 이때 membrane과 3MM paper를 gel과 같은 크기로 자른 뒤(membrane은 transfer효과를 높이기 위하여 methanol에 5분간 보관한 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate, Sigma) 처리된 증류수로 다시 5분간 세척하였다.) 2X SSC(30mM Na₃citrate, 0.3M NaCl, pH7.0) 용액에 transfer 직전까지 보관하였다. 모든 처리가 끝난 gel은 20X SSC(0.3M Na₃citrate, 3M NaCl, pH7.0)용액 하에서 membrane에 16시간동안 transfer 되었으며, transfer가 끝난 뒤 membrane은 6X SSC(90mM Na₃citrate, 0.9M NaCl, pH7.0)용액에 5분간 세척하여 gel 조각을 제거하고 나서 UV 투사기에서 RNA가 제대로 membrane에 옮겨졌는지 확인하였다. 이때 transfer 된 gel 또한 EtBr 용액에서 10분 동안 염색하여 RNA 잔유물이 남아있는지 확인하였다.

Probe는 RNA fingerprinting 분석으로부터 얻은 band를 사용했으며, 500ng의 DNA를 95°C에 5분간 보관하여 완전변성시킨 뒤 nucleotide mix(Gene Images random prime labelling kit; Amersham) 10 μ l, primer 5 μ l, klenow enzyme(5unit/ μ l) 1 μ l를 첨가하고 최종 50 μ l의 양으로 37°C에서 3시간 이상 보관하였다.

Pre-hybridization은 hybridization 전용 tube에 membrane과 65°C로 미리 가열된 hybridization buffer(1:20 liquid block, 0.1%(w/v) SDS, 5%(w/v) dextran sulphate)를 넣고 3시간동안 수행하였으며, 3시간 뒤 기존의 buffer는 제거하고 hybridization buffer[1:20 liquid

block, 0.1%(w/v) SDS, 5%(w/v) dextran sulphate]와 작성된 probe(95°C에서 5분간 처리하여 완전 변성된)를 첨가하고 65°C에서 16시간동안 hybridization시켰다.

Hybridization이 끝난 뒤 membrane에 붙지 않은 probe를 제거하기 위하여, 1X SSC(15mM Nascitrate, 0.15M NaCl, pH7.0), 0.1%(w/v) SDS 용액과 0.1X SSC(1.5mM Nascitrate, 15mM NaCl, pH7.0), 0.1%(w/v) SDS 용액에 각각 20분씩 최종 2회에 걸쳐 membrane을 세척하였다. 세척된 membrane은 liquid blocking agent를 buffer A(100mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 9.5)로 1:10 희석시킨 용액 40ml(0.75-1.0 ml/cm² of membrane)에 실온에서 1시간동안 incubation시켰으며, 다시 anti-fluorescein-AP conjugate를 0.5%(w/v)의 bovine serum albumin이 함유된 buffer A(100mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 9.5)로 1:5,000 희석시킨 용액 15ml(0.3ml/cm² of membrane)에 실온에서 1시간동안 incubation 시켰다. 그후 붙지 못한 conjugate를 제거하기 위하여 0.3%(w/v) tween 20이 함유된 buffer A(100mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 9.5) 100ml(2-5 ml/cm² of membrane)로 실온에서 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였으며, 전과정이 끝난 membrane은 CDP-Star를 이용해 X-ray film에 1시간동안 발광시킨 후 결과를 관찰하였다.

9) Southern hybridization 분석

일품벼와 저피탄산 돌연변이 개체인 P21, P23, P24, P27의 genomic DNA 10μg을 제한효소인 *Xba* I, *EcoR* I, *EcoR* V, *Kpn* I, *Sac* I, *Sal* I, *Sca* I, *Dra* I, *Hind* III, *BamH* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hha* I, *Taq* I을 사용하여 12시간동안 반응시켜 DNA를 절단한 후, 절단된 DNA를 0.8% agarose gel에 loading하여 30 voltage로 12시간 전기영동 시키고 UV 상자를 통해 full digestion의 여부를 확인하였다. 전기영동한 agarose gel은 0.25N HCl 용액에 넣고 10분간 shaking한 후 증류수로 씻어내고, denaturing solution(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)에 30분동안 보관한 뒤 transfer용액인 0.4N NaOH 용액 하에 12시간동안 membrane에 transfer되었다. Transfer가 끝난 후 membrane은 6X SSC용액에 5분간 shaking한 후 3MM paper 사이에 넣고 실온에서 1시간동안 건조 시켰다. Probe는 RNA fingerprinting 분석으로부터 얻은 band를 사용했으며, cloning된 plasmid를 재료로 PCR을 이용해 direct labelling하였다.

Transfer된 membrane은 standard hybridization solution(5X SSC, 0.02% SDS, 0.1% N-lauroylsarcosine, 1% blocking reagent)하에 62℃에서 1시간동안 pre-hybridization 시킨 다음 기존의 solution을 제거하고, denature된 probe가 함유된 새로운 standard hybridization solution하에서 62℃에서 12시간동안 hybridization하였다. Hybridization이 끝난 뒤 membrane에 붙지 않은 probe를 제거하기 위하여, 2X SSC, 0.1%(w/v) SDS 용액과 0.1X SSC, 0.1%(w/v) SDS 용액에 각각 20분씩 최종 2회에 걸쳐 membrane을 세척하였다. 세척된 membrane은 blocking stock solution을 maleic acid buffer로 1:10 희석시킨 용액에 실온에서 30분 동안 incubation시켰으며, 다시 anti-dig-AP conjugate를 전 과정에서 사용된 buffer로 1:5,000 희석시킨 용액에 실온에서 30분 동안 incubation 시켰다. 그후 붙지 못한 conjugate를 제거하기 위하여 0.3%(w/v) tween 20이 함유된 maleic acid buffer로 실온에서 15분씩 2회에 걸쳐 세척하였으며, 전과정이 끝난 membrane은 CSPD를 이용해 X-ray film에 30분 동안 발광시킨 후 결과를 관찰하였다.

4. cDNA library의 작성

대부분 다세포 생물의 특징은 각 세포의 특징에 따라 다르다. 예컨대 사람은 뇌세포, 혈액 세포, 간세포 등 수많은 다양한 세포들로 구성되어 있다. 물론 각 세포들은 동일한 유전자 구성을 갖고 있으나 상이한 세포에서는 상이한 유전자군이 활성화되고 다른 유전자는 활성화되지 않은 상태로 있다. 클론되는 것이 DNA가 아니고 전령 RNA(mRNA)라면 한 종류의 세포에서는 상대적으로 소수의 유전자만이 발현된다는 사실이 유전자 도서관을 만드는데 이용될 수 있다. 발현될 유전자만이 mRNA로 전사되어, 만약 이 mRNA로부터 유전자 도서관이 만들어 진다면, 그 결과로 생기는 클론은 세포 내에서 전체의 유전자 중에서 선발된 일부 유전자만을 함유하게 된다.

mRNA는 그 자체가 클로닝 운반체에 접합될 수 없지만, 상보성 DNA(cDNA) 합성에 의해 DNA로 전환될 수 있다. 이 방법의 열쇠는 존재하는 RNA 한 가닥선에 상보적인 DNA 폴리뉴클레오티드를 합성하는 역전사 효소이다. 일단 cDNA 가닥이 합성되면 RNA와 DNA가 공존하는 분자에서 RNA는 약알칼리 처리로 분해될 수 있다. 이 단일가닥 cDNA는 DNA 중합

효소 I의 Klenow단편을 이용하여 이중가닥 cDNA로 전환되고, 만들어진 DNA 단편을 운반체에 접합하여 클론시킬 수 있다. 결과적으로 얻어진 cDNA 클론은 원래의 표본에 있던 mRNA를 대표하게 된다.

DD-RT PCR 및 AFLP-based mRNA fingerprinting기법을 통해 얻은 단편들의 전체염기서열을 얻기 위하여 일품 및 일품벼로부터 유기된 돌연변이 개체인 P21의 mRNA를 Universal RiboClone^(R) cDNA Synthesis System(Promega), Lambda gt10 System(Promega), Packagene^(R) Lambda DNA Packaging System(Promega)을 이용하여 각각의 cDNA 도서관을 작성하였다.

가. 실험 방법

1) Double strand cDNA의 합성 및 *EcoR* I adaptor ligation

가) First strand cDNA의 합성

일품과 돌연변이 개체인 P21로부터 추출한 각각의 mRNA 2 μ g을 oligo(dT)₁₅ primer(0.5 μ g/ μ l) 2 μ l와 혼합한 뒤 최종 15 μ l의 양으로 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 보관하여 mRNA를 완전변성시키고 바로 얼음 상자에 5분간 방치함으로 인해 oligo(dT)₁₅ primer가 mRNA의 3' 말단에 존재하는 poly A tail에 binding할 수 있도록 하였다. 그후 first strand 5X buffer[250mM Tris-HCl, pH 8.3(at 42 $^{\circ}$ C), 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 2.5mM spermidine, 50mM DTT, 5mM ea dATP, dCTP, dGTP, dTTP] 5 μ l, RNasin^(R) Ribonuclease Inhibitor(40unit/ μ l) 40unit, sodium pyrophosphate(40mM) 2.5 μ l 그리고 AMV reverse transcriptase(23unit/ μ l) 30unit를 첨가한 뒤 nuclease-free water를 이용해 최종 25 μ l의 양을 맞추고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응을 진행시켜 first strand cDNA를 합성하였다.

나) Second strand cDNA의 합성

First strand 합성 반응으로부터 얻은 산물 25 μ l에 second strand 2.5X buffer(100mM Tris-HCl, pH 7.2, 225mM KCl, 7.5mM MgCl₂, 7.5mM DTT, 0.125mg/ml bovine serum albumin) 40 μ l, *E. coli* DNA polymerase I(10unit/ μ l) 23unit, *E. coli* RNase H(2unit/ μ l) 0.8unit를 첨가한 뒤 nuclease-free water를 이용해 최종 100 μ l의 양을 맞추고 14 $^{\circ}$ C에서 3시

간동안 반응을 진행시켰다. 반응이 끝난 후 70°C에서 10분간 방치함으로 각각의 효소들의 활성을 불활성화 시켰으며, T4 DNA polymerase(10unit/ μ l) 4unit를 다시 첨가하고 37°C에서 10분간 보관하여 5' 말단에 생긴 gap을 제거하였다. 그리고 200mM EDTA용액을 10 μ l 첨가함으로 모든 반응을 종료하였다.

Second strand 합성 반응이 끝난 후 반응액으로부터 double strand cDNA를 순수 분리하기 위하여 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)로 정제된 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 동량 첨가하고 섞어준 뒤 14,000rpm에서 2분간 원심분리 하였다. 원심분리가 끝난 후 상층액을 조심스럽게 취하여 새 튜브에 옮기고 1/2의 7.5M ammonium acetate와 2.5배의 cold ethanol을 첨가하여 잘 섞은 뒤에 -70°C 냉동고에 1시간동안 보관하였다. 보관된 튜브로부터 cDNA를 침전시키기 위하여 14,000rpm에서 20분간 원심분리를 하였으며, 침전된 cDNA는 70% cold ethanol로 세척한 뒤 SPINVAC(vacuum concentration system)을 이용해 건조시켰다. 건조된 cDNA는 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0) 50 μ l에 다시 녹였다.

다) *EcoR* I adaptor의 ligation

합성된 cDNA에 *EcoR* I adaptor를 ligation시키기 앞서 400bp보다 작은 크기의 cDNA는 Sephacryl^(R) S-400을 이용해 제거하였다(ligation효율을 높이기 위하여).

준비된 cDNA 250ng에 T4 DNA ligase 10X buffer(300mM Tris-HCl, pH 7.8, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 5mM ATP) 3 μ l, acetylated BSA(1mg/ml) 3 μ l, *EcoR* I adaptor(10pmole) 1 μ l, T4 DNA ligase(3unit/ μ l) 2.5unit 첨가한 뒤 nuclease-free water를 이용해 최종 30 μ l의 양을 맞추고 14°C에서 12시간동안 반응을 진행시켜 cDNA에 *EcoR* I adaptor를 ligation시켰으며 반응이 끝난 후 70°C에서 10분간 보관함으로 T4 DNA ligase의 활성을 불활성화 시켰다.

라) cDNA의 phosphorylation

EcoR I adaptor끼리의 ligation 그리고 vector DNA의 self ligation을 방지하기 위하여 dephosphorylation 처리가 되어있는 상태이기 때문에 효과적인 cloning 환경을 만들기 위하여

제작한 cDNA에 phosphorylation처리를 하여야한다.

Ligation반응으로부터 얻은 반응액 30 μ l에 T4 polynucleotide kinase 10X buffer(700mM Tris-HCl, pH 7.6, 100mM MgCl₂, 50mM DTT) 4 μ l, 0.1mM ATP 2 μ l, T4 polynucleotide kinase (10unit/ μ l) 1 μ l를 첨가한 뒤 nuclease-free water를 이용해 최종 40 μ l의 양을 맞추고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응을 진행시켰다. Phosphorylation 반응이 끝난 후 반응액으로부터 cDNA를 순수 분리하기 위하여 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)로 정제된 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 동량 첨가하고 섞어준 뒤 14,000rpm에서 2분간 원심분리 하였다. 원심분리가 끝난 후 상층액을 조심스럽게 취하여 새 튜브에 옮기고 1/2의 7.5M ammonium acetate와 2.5배의 cold ethanol을 첨가하여 잘 섞은 뒤에 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 1시간동안 보관하였다. 보관된 튜브로부터 cDNA를 침전시키기 위하여 14,000rpm에서 20분간 원심분리를 하였으며, 침전된 cDNA는 70% cold ethanol로 세척한 뒤 SPINVAC(vacuum concentration system)을 이용해 건조시켰다. 건조된 cDNA는 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0) 50 μ l에 다시 녹였다. 마지막으로 vector DNA에 대한 insert cDNA의 ligation 효율을 극대화시키기 위하여 Sephacryl^(R) S-400을 이용해 cDNA와 함께 잔존하는 *EcoR* I adaptor를 다시 제거하였으며 ethanol precipitation 단계를 거쳐 cDNA를 농축시켰다.

2) Lambda gt10 vector에 제작된 cDNA의 ligation

EcoR I으로 절단된 lambda gt10 vector 1 μ g에 제작된 cDNA 30ng, T4 DNA ligase 10X buffer (400mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP, 500 μ g/ml bovine serum albumin) 1 μ l, T4 DNA ligase(3unit/ μ l) 3unit를 첨가한 뒤 nuclease-free water를 이용해 최종 10 μ l의 양을 맞추고 14 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응을 진행시켰다. 반응이 끝난 후 packaging하기 전까지 반응액을 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관하였다.

3) cDNA가 삽입된 lambda gt10 vector의 packaging

Packaging을 수행하기 전날 LE392[genotype of LE392:F, *hsdR574*(r_k, m_k'), *supE44*, *supF58*, *lacY1* or Δ (*lacIZY*)6, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*] bacteria의 single colony를 선

발해서 0.2% maltose와 10mM MgCl₂가 첨가된 LB배지(10g Bacto^(R)-Tryptone, 5g Bacto-Yeast Extract, 5g NaCl, pH 7.0;per liter)에 접종한 후 37°C shaker를 이용해 OD₆₀₀에서 0.6-0.8이 되도록 진탕배양 하였다. 자란 cell은 사용하기 전까지 4°C 냉장고에 보관하였다.

Packaging extract를 얼음 상자에 보관하면서 extract가 녹자마자 ligation 반응으로부터 얻은 반응액 5 μ l를 첨가하고 조심스럽게 섞어준 뒤 22°C 항온 수조에서 3시간동안 반응을 진행시켰다. 반응이 끝난 후 각각의 packaging 혼합물에 phage buffer(20mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 10mM MgSO₄) 445 μ l와 chloroform 20 μ l를 첨가하고 천천히 inversion하면서 잘 섞어주었으며 그후 packaging 반응으로부터 얻은 반응액 25 μ l와 4°C 냉장고에 보관된 bacteria 100 μ l를 섞은 뒤 30°C incubator에 30분 동안 보관하여 bacteria에 phage가 감염될 수 있게 하였다. 그리고 감염된 bacteria에 10ml의 TB top agar(Bacto-Tryptone 1g, NaCl 0.5g, agar 0.8g, 1M MgSO₄ 1ml;per 100ml)를 첨가하여 150mm petri dish에 준비된 LB plate(10g Bacto^(R)-Tryptone, 5g Bacto -Yeast Extract, 5g NaCl, agar 15g, pH 7.0;per liter)에 결이 생기지 않도록 부었다. 약 10분 후 top agar가 굳은 다음 37°C incubator에 12시간동안 기른 뒤 생성되는 plaque을 확인하였다.

5. mRNA의 AFLP fingerprinting

일품벼와 돌연변이 개체인 P21로부터 추출된 mRNA를 Universal RiboClone^(R) cDNA Synthesis System(Promega)을 이용하여 cDNA를 합성하였으며 합성된 cDNA를 재료로 AFLP 분석을 수행하였다.

가. 실험 방법

1) First strand cDNA의 합성

먼저 추출한 RNA로부터 first strand cDNA를 합성하기 앞서 DNase I 처리를 함으로서 genomic DNA의 오염을 제거하였다.

일품과 돌연변이 개체인 P21로부터 추출한 각각의 mRNA 4 μ g을 EV40 primer[5' AGTGA ATTCT₁₂V(V=A,G,C)3' ; 5pmol/ μ l] 4 μ l와 혼합한 뒤 최종 30 μ l의 양으로 70°C에서 10분간 보관하여 mRNA를 완전변성 시키고 바로 얼음 상자에 5분간 방치함으로 인해 EV40 primer

가 mRNA의 3' 말단에 존재하는 poly A tail에 binding할 수 있도록 하였다. 그후 first strand 5X buffer[250mM Tris-HCl, pH 8.3(at 42°C), 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 2.5mM spermidine, 50mM DTT, 5mM ea dATP, dCTP, dGTP, dTTP] 10 μ l, RNasin^(R) Ribonuclease Inhibitor(40unit/ μ l) 80unit, sodium pyrophosphate(40mM) 5 μ l 그리고 AMV reverse transcriptase(23unit/ μ l) 60unit를 첨가한 뒤 nuclease-free water를 이용해 최종 50 μ l의 양을 맞추고 42°C에서 1시간동안 반응을 진행시켜 first strand cDNA를 합성하였다.

2) Second strand cDNA의 합성

First strand 합성 반응으로부터 얻은 산물 50 μ l에 second strand 2.5X buffer(100mM Tris-HCl, pH 7.2, 225mM KCl, 7.5mM MgCl₂, 7.5mM DTT, 0.125mg/ml bovine serum albumin) 80 μ l, *E. coli* DNA polymerase I(10unit/ μ l) 46unit, *E. coli* RNase H(2unit/ μ l) 1.6unit를 첨가한 뒤 nuclease-free water를 이용해 최종 200 μ l의 양을 맞추고 14°C에서 3시간동안 반응을 진행시켰다. 반응이 끝난 후 70°C에서 10분간 방치함으로 각각의 효소들의 활성을 불활성화 시켰으며, T4 DNA polymerase(10unit/ μ l) 8unit를 다시 첨가하고 37°C에서 10분간 보관하여 5' 말단에 생긴 gap을 제거하였다. 그리고 200mM EDTA용액을 20 μ l첨가함으로 모든 반응을 종료하였다.

Second strand 합성 반응이 끝난 후 반응액으로부터 double strand cDNA를 순수 분리하기 위하여 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)로 정제된 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 동량 첨가하고 섞어준 뒤 14,000rpm에서 2분간 원심분리 하였다. 원심분리가 끝난 후 상층액을 조심스럽게 취하여 새 튜브에 옮기고 1/2의 7.5M ammonium acetate와 2.5배의 cold ethanol을 첨가하여 잘 섞은 뒤에 -70°C 냉동고에 1시간동안 보관하였다. 보관된 튜브로부터 cDNA를 침전시키기 위하여 14,000rpm에서 20분간 원심분리를 하였으며, 침전된 cDNA는 70% cold ethanol로 세척한 뒤 SPINVAC(vacuum concentration system)을 이용해 건조시켰다. 건조된 cDNA는 nuclease-free water 40 μ l에 다시 녹였다.

3) AFLP fingerprinting

합성된 cDNA 2 μ g을 *EcoR* I(Gibco) 10unit를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 절단한 후 1/2의 7.5M ammonium acetate와 2.5배의 ethanol을 첨가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 보관한 후 14,000rpm 에서 30분 동안 원심분리 하여 절단된 cDNA를 침전시켰다. 침전된 cDNA는 실온에서 충분히 말린 후 *Mse* I(Gibco)으로 cDNA를 다시 절단하였으며, 전체 부피의 1/2의 7.5M ammonium acetate 와 2.5배의 ethanol 을 첨가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 보관한 후 14,000rpm 에서 30분 동안 원심분리 하여 절단된 cDNA를 침전시켰다. 침전된 cDNA는 멸균된 3차 증류수에 녹인 뒤 5unit의 T4 DNA ligase(Promega)와 0.5 μ M의 *EcoR* I/*Mse* I adaptor를 첨가한 후 14 $^{\circ}$ C에서 12시간 ligation 시켰다. Ligation된 cDNA는 1:10으로 희석하여 pre-amplification을 하기 위한 재료로 사용하였다.

Pre-amplification의 PCR 반응조건은 희석된 cDNA 5 μ l에 1X buffer(10mM Tris-HCl, pH8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% Triton X 100), 200 μ M dNTP, 0.5 μ M *EcoR* I-0/*Mse* I-1 primer, 1unit Taq DNA polymerase(Dynazyme)를 첨가하여 최종 50 μ l의 양으로 Perkin-Elmer thermal cyler에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분을 1cycle로 최종 20회 반복하고 반응을 종료하였다. Pre-amplification의 PCR 산물은 1 : 50으로 희석하여 2차 PCR 반응을 수행하기위한 재료로 사용하였다. 2차 PCR 반응의 조건은 Pre-amplification으로부터 희석된 DNA 5 μ l에 1X buffer(10mM Tris-HCl, pH8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% Triton X 100), 200 μ M dNTP, 0.5 μ M *EcoR* I-0/*Mse* I-3 primer, 1unit Taq DNA polymerase(Dynazyme)를 첨가하여 최초 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 65 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 첫 cycle로 시작하여 다음 cycle 부터는 annealing 온도를 1 $^{\circ}$ C씩 감소시키면서 10cycle을 반복한 뒤 마지막으로 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 23회 반복하고 반응을 종료하였다.

최종 PCR 반응이 끝난후 PCR산물 6 μ l를 취하여 formamide loading dye(95% formamide, 10mM EDTA, pH8.0, 0.05% bromo phenol blue, 0.05% Xylene cyanol FF) 4 μ l와 혼합한 뒤 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 다음 그중 6 μ l를 55 $^{\circ}$ C로 미리 가열된 6% denaturing polyacrylamide gel [acrylamide:bisacrylamide(19:1) , 7.5M urea, 1X TBE(0.89M Tris-HCl, pH8.3, 0.89M

boric acid, 0.02M EDTA, pH8.0)]에 loading한 후 1800V 80W에서 3시간동안 전기영동 한 다음 전개된 band들을 silver staining법으로 염색한 후 형광상자에서 결과를 분석하였다

6. *Aspergillus* Phytase 유전자의 분리

*Aspergillus*의 phytase 유전자로부터 2개(Phy-1, Phy-31)의 primer를 작성하였으며, PCR 증폭은 일품벼의 genomic DNA와 돌연변이 개체인 P21의 genomic DNA 50ng에 1X enzyme buffer, 200 μ M dNTP(Promega), 0.5 μ M의 Phy-1, Phy-31 Primer, 2.5 unit expended *Taq* DNA Polymerase(PERKIN ELMER), 1.2mM Mg(OAC)₂의 조성으로 된 50 μ l의 반응액에 25 μ l의 mineral oil(Sigma)을 첨가하여 PTC-100 thermocycler(MJ Research Inc.)에서 94 $^{\circ}$ C 초기 완전변성을 시키기 위해 1분간 반응시킨 후, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 7분을 1 cycle로 최종 16cycles을 반복하고 다음 12cycle은 extention time을 1cycle마다 15초씩 증가시킨 다음 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 더 진행시킨 후 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. PCR 증폭 후 얻은 산물 10 μ l 와 6X loading dye 2 μ l를 혼합하여 0.8% agarose gel에 loading하고 50V에서 2시간 동안 전기영동 한 후 UV 상자를 이용하여 전개된 band들을 관찰하였다. PCR결과 증폭된 DNA단편들은 pGEM-T EASY vector를 이용하여 클로닝 하였으며, ALFexpress automated sequencer를 이용하여 전체염기서열을 결정하였다.

제 3 절 결 과

1. 1차 년도

가. RAPD 분석 결과

영덕벼와 저 피탄산 돌연변이 식물체 1-13-7의 genomic DNA를 추출하여 변이계통간의 유전적 차이를 285개의 random primers로 screening하여 약 4000개의 증폭된 단편들을 분석하였다. 그러나 전체 4,000개의 단편 중 3차까지 재현성의 여부를 검증 한 결과 3차까지 재현되는 DNA 단편은 발견 할 수가 없었다(Fig. 1).

나. Genomic DNA AFLP 분석 결과

RAPD분석에 이어 피탄산 합성에 관련된 마커를 선별하기 위하여 좀더 분석력이 뛰어난 AFLP기법을 본 실험에 도입하였다. 그러나 genomic AFLP분석 결과 사용된 4개의 EcoR I-2 primer 와 4개의 Mse I-3 primer간 전체 16조합에서 AFLP 분석을 수행하였으나, 어떠한 조합에서도 control 혹은 mutant에 존재하는 marker를 발견할 수 없었다. 따라서 AFLP가 분석력에서 뛰어난 기법이라 할지라도 본 과제에는 적당하지 않은 분석법으로 사료되며, 여타의 다른 기법을 도입한다 하더라도 genomic DNA 수준에서 marker를 확보하는 것은 어려울 것으로 사료된다(Fig. 2-3).

2. 2차 년도

가. DD-RT PCR 분석 결과

영덕벼와 돌연변이 개체중 선별된 1-13-7, 6-5-4 모두 개화 2주 후 미숙 종실이 형성되었을 때 대량의 이삭을 채취하여 액체질소에 급냉 시킨 후 -70℃ 냉동고에 보관함으로써 재료를 확보하였다. 처음에 종실자체를 재료로하여 total RNA를 추출한 결과 종실에 함유되어있는 전분과 당분 때문에 순수한 total RNA를 분리할 수 없었다. 이후 phytic acid의 경우 벼 종실의 호분층에 집적된다는 힌트를 얻어 종실로부터 핀셋과 메스를 이용해 종실이 녹기 전에 배와 배유부분을 제거하고 호분층만을 채취하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 spectrophotometer를 이용해 농도를 측정하였으며 formaldehyde agarose gel 에서 전기영동한 후 농도를 확인하였다. 그리고 각각 같은 농도의 RNA 상에서 T₁₁CA 와 random primer 319, 383, 401(각 번호는 각기 염기서열이 다른 일련번호를 나타냄) 그리고 T₁₂GC 와 random primer 319, 383, 401조합으로 differential display PCR을 수행한 결과 T₁₁CA 와 random primer 319 조합에서 영덕에만 존재하고 돌연변이개체에는 존재하지 않는 250bp 가량의 단편을 얻을 수 있었다. 그리고 T₁₂GC 와 random primer 319 조합에서도 마찬가지로 영덕에는 존재하지만 돌연변이 개체에는 존재하지 않는 220bp 의 단편을 1개 얻을 수 있었다. 그 외 나머지 조합에서는 다형성을 보이는 band를 찾을 수 없었다(Fig. 4).

다형성을 보이는 band를 많이 확보하기 위하여 다른 primer 조합간을 분석한 결과, T₁₁CA 와 random primer 171, 200, 290, 355, 470, 503, 648, 669, 711, 799 간의 조합에서는 영덕에만

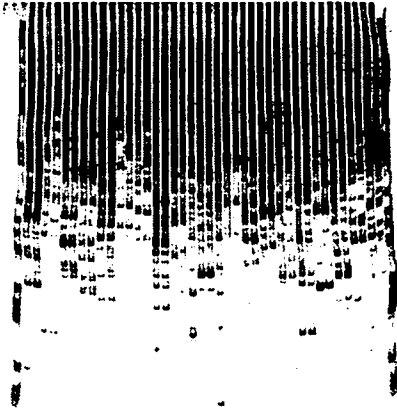


Figure 1. RAPD analysis between control and mutant.

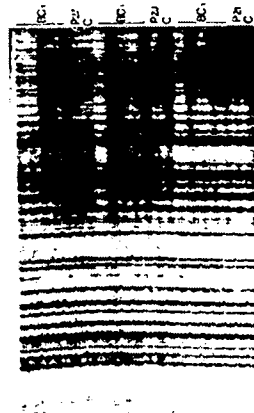


Figure 2. Genomic DNA AFLP analysis between control and mutants.

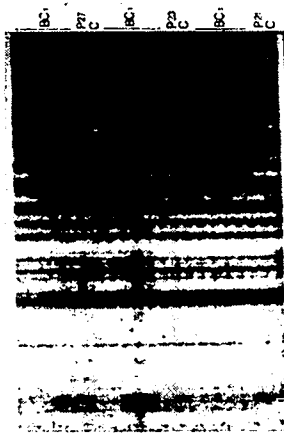


Figure 3. Genomic DNA AFLP analysis between control and mutants.

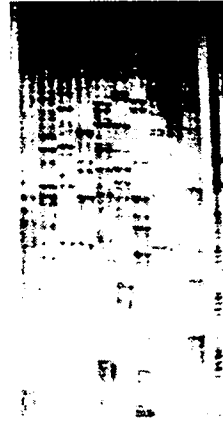


Figure 4. DD-RT PCR analysis control and mutant.

존재하는 6개의 band($T_{11}CA$ 와 random primer 200 조합으로부터 얻은 260bp의 단편, $T_{11}CA$ 와 random primer 200 조합으로부터 얻은 240bp의 단편, $T_{11}CA$ 와 random primer 456 조합으로부터 얻은 370bp의 단편, $T_{11}CA$ 와 random primer 648 조합으로부터 얻은 210bp의 단편, $T_{11}CA$ 와 random primer 711 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, $T_{11}CA$ 와 random primer 711 조합으로부터 얻은 290bp의 단편)와 돌연변이 개체에만 존재하는 3개의 band($T_{11}CA$ 와 random primer 171 조합으로부터 얻은 230bp의 단편, $T_{11}CA$ 와 random primer 200 조합으로부터 얻은 240bp의 단편, $T_{11}CA$ 와 random primer 456 조합으로부터 얻은 320bp의 단편)를 얻었다.

$T_{11}A$ 와 random primer 134, 200, 290, 319, 383, 470, 503, 669, 733, 799 조합에서는 돌연변이 개체 1-13-7과 6-5-4 이 두 개체를 영덕과 함께 비교하였으며 6-5-4에만 존재하는 10개의 band를 얻을 수 있었다. 그러나 6-5-4의 경우 돌연변이 정도가 상당히 심한 것으로 미루어 phytic acid 합성유전자의 일부가 증폭되었을 가능성은 희박할 것으로 사료된다. $T_{11}CG$ 와 random primer 134, 200, 290, 319, 383, 470, 503, 669, 733, 799 에서는 돌연변이 개체에만 존재하는 band($T_{11}CG$ 와 random primer 200 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, $T_{11}CG$ 와 random primer 290 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, $T_{11}CG$ 와 random primer 503 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, $T_{11}CG$ 와 random primer 669 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, $T_{11}CG$ 와 random primer 733 조합으로부터 얻은 300bp의 단편) 5개를 얻을 수 있었다.

Differential display PCR 결과 $T_{11}CA$ 와 random primer 조합으로부터 얻은 10개의 단편, $T_{11}A$ 와 random primer 조합으로부터 얻은 10개의 단편, $T_{11}CG$ 와 random primer 조합으로부터 얻은 5개의 단편 모두 gel로부터 절취하여 각각의 PCR tube에 옮긴 다음 gel 속에 있는 DNA에 대해 특별한 elution과정을 거치지 않고 gel 조각을 바로 재증폭을 위한 재료로 사용하여 재증폭을 수행하였다. 재증폭한 반응물을 1.5% agarose gel에 확인한 결과 단일 band가 증폭되었으며 각각의 band 마다 DD-RT PCR로부터 얻은 band의 크기와 동일함을 확인 할 수 있었다.

재증폭이 끝난 후 각각의 단편들은 pGEM^(R)-T Easy vector(Promega)를 이용해 클로닝을

수행하였으며 재증폭한 band와 같은 크기의 insert가 존재하는 vector에 한하여 manual method 및 automated sequencer를 이용하여 전체염기서열을 결정하였다.

각각의 조합에서 선발된 band의 전체염기서열을 결정한 뒤 blast search를 실시한 결과 T₁₁CA 와 319조합으로 부터 얻은 band는 *Glycine max* cellulase gene과 80%에 가까운 상동성을 보였다. 그리고 T₁₁CG 와 random primer 조합으로부터 얻은 band를 probe로 하여 northern hybridization 분석을 수행한결과 differential display PCR 을 결과와 상당히 일치하는 것을 볼 수 있었다.

일품버의 경우 cDNA library의 작성을 함께 수행하기 위하여 total RNA가 아닌 mRNA를 추출하여 differential display PCR을 수행하였다. 수행방법은 영덕버 에서 수행했던 방법과 동일하게 하였으며, PCR 결과 T₁₁CA 와 random primer 조합에서 일품에만 존재하는 band(T₁₁CA 와 random primer 112 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 112 조합으로부터 얻은 260bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 116 조합으로부터 얻은 330bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 124 조합으로부터 얻은 330bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 124 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 124 조합으로부터 얻은 160bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 128 조합으로부터 얻은 310bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 128 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 131 조합으로부터 얻은 250bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 133 조합으로부터 얻은 180bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 136 조합으로부터 얻은 300bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 164 조합으로부터 얻은 450bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 164 조합으로부터 얻은 280bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 164 조합으로부터 얻은 250bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 235 조합으로부터 얻은 420bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 235 조합으로부터 얻은 290bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 235 조합으로부터 얻은 270bp의 단편) 17개와 돌연변이 개체에만 존재하는 band(T₁₁CA 와 random primer 124 조합으로부터 얻은 320bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 124 조합으로부터 얻은 310bp의 단편) 2개를 선발하였다.

Differential display PCR 결과 T₁₁CA 와 random primer 조합으로부터 얻은 19개의 단편 모두 gel로부터 절취하여 각각의 PCR tube에 옮긴 다음 gel 속에 있는 DNA에 대해 특별한 elution과정을 거치지 않고 gel 조각을 바로 재 증폭을 위한 재료로 사용하여 재 증폭을 수행하였다. 재 증폭한 반응물을 1.5% agarose gel에 확인한 결과 단일 band가 증폭되었으며 각각의 band 마다 DD-RT PCR로부터 얻은 band의 크기와 동일함을 확인 할 수 있었다.

재 증폭이 끝난 각각의 단편들은 pGEM^(R)-T Easy vector(Promega)에 삽입시켰으며 기존의 방법에 의거해 insert가 있을 것으로 사료되는 colony(white)를 선발하여 액체배지에 배양한 뒤 plasmid를 추출하였다. 추출된 plasmid를 *EcoR* I으로 절단하여 1.5% agarose gel에 전기영동한 결과 최초로 선발한 band와 같은 크기의 insert DNA가 확인되었다. Cloning이 확인된 plasmid에 한하여, pGEM^(R)-T Easy vector(Promega)의 경우 sequencing이 가능한 vector이므로 automated sequencer를 이용하여 19개 단편의 전체염기서열을 결정하였다.

결정된 각 단편의 전체염기서열을 이용해 blast search를 수행하였으며 그 결과 T₁₁CA 와 random primer 124 조합으로부터 얻은 320bp의 단편의 경우 Rice Immature Seed Lambda ZAPII cDNA library *Oryza sativa* cDNA clone(ISAJ0153)과 90%이상의 상동성을 보였다. 그러나 이 단편의 경우 돌연변이 개체인 P21에만 존재하는 단편이므로 피틴산 합성유전자 보다는 피틴산 해리 및 조절 유전자에 더 가까울 것으로 예상된다. 그리고 T₁₁CA 와 random primer 128 조합으로부터 얻은 300bp의 단편의 경우 Rice cDNA, partial sequence (R1037-2B)와 마찬가지로 90% 이상의 상동성을 보였다.

전체염기서열의 결정과 아울러 피틴산 합성 및 해리에 관련될 것으로 예상되는 단편(영덕벼로부터 얻은, T₁₁CA 와 319조합으로 부터 얻은 250bp의 단편; 일품벼로부터 얻은, T₁₁CA 와 random primer 112 조합으로부터 얻은 260bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 124 조합으로부터 얻은 320bp의 단편, T₁₁CA 와 random primer 128 조합으로부터 얻은 300bp의 단편)들을 이용해 northern hybridization을 수행하였으며 그 결과 T₁₁CA 와 random primer 112 조합으로부터 얻은 260bp의 단편을 probe로 사용한 경우 일품과 P21에서 서로 크기가 다른 2개의 signal을 얻을 수 있었다. 이것은 아마도 전사과정에 있어 terminator부분에 돌연

변이가 일어나 전사과정이 연장된 것이 아닌가 추측 할 수 있었다. 그 외 나머지 단편들에 있어서는 PCR의 결과와 동일한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 5).

또한 이들의 DNA 단편들을 probe로 하여 southern hybridization 분석을 수행한 결과, 본 분석에 사용된 일품벼와 돌연변이 개체들인 P21, P23, P23, P27간에 다형성은 보이지 않았으나 각각의 단편에 해당하는 유전자들은 모두 single gene으로 존재하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 6-7).

3. 3차 년도

가. cDNA library 구축

확보된 각각의 단편들의 전체염기서열을 확보하기 위하여 일품 및 저 피틴산 돌연변이 개체인 P21의 mRNA를 Universal RiboClone^(R) cDNA Synthesis System(Promega), Lambda gtl0 System (Promega), Packagene^(R) Lambda DNA Packaging System(Promega)을 이용하여 각각의 cDNA library를 작성하였다. 그리고 packaging된 phage를 순차적으로 회석하여 plating하였으며, 각각의 LB plate에 형성된 plaque의 수를 확인하여 library size를 측정한 결과 control 과 mutant 모두 15만개 이상의 plaque 수를 포함하고 있었다.

나. mRNA-AFLP 분석 결과

일품벼와 저 피틴산 돌연변이 개체인 P21로부터 추출한 mRNA를 double strand cDNA로 합성하고, genomic DNA를 사용하는 대신 이들 cDNA를 재료로 사용한 것만 다를 뿐 genomic AFLP와 같은 방법으로 실험을 수행하였으며, *EcoR* I-0 primer와 16개의 *Mse* I-3 primer를 사용하여 분석한 결과 일품에만 존재하는 63개의 단편과 돌연변이 개체인 P21에만 존재하는 32개의 단편을 확보하였다. 최종 95개의 단편들은 모두 gel로부터 절취하여 재 증폭을 수행하였으며, 재 증폭된 단편들은 모두 membrane에 transfer하였다. 각각의 단편들은 일품벼로부터 얻은 cDNA와 저 피틴산 돌연변이 개체인 P21로부터 얻은 cDNA를 probe로 하여 reverse northern 분석을 수행함으로써 다형성의 진위 여부를 검증한 결과 돌연변이 개체에만 존재하는 단편들 중 17개의 단편들은 reverse northern 분석 결과 mRNA-AFLP 결과와 일치하였다(Fig. 8-10).



Figure 5. Northern blot analysis using mutant specific probes.

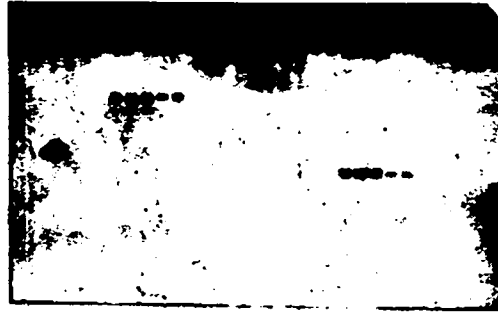


Figure 6. Southern blot analysis using control specific probe.



Figure 7. Southern blot analysis using mutant specific probe.



Figure 8. mRNA-AFLP analysis between control and mutant.

다. Phytase 유전자의 분리

*Aspergillus*의 phytase 유전자로부터 작성한 2개(Phy-1, Phy-31)의 primer를 이용하여 일 품벼의 genomic DNA와 돌연변이 개체인 P21의 genomic DNA로부터 증폭여부를 시험하였다. PCR을 수행한 결과 1kb, 2kb, 3kb 크기의 DNA 단편이 증폭되었으며, 이들 DNA 단편들은 pGEM-T EASY vector를 이용하여 클로닝 한 후 자동염기서열 분석기를 이용하여 전체 염기서열을 결정하였다. 이들 중 1069bp 단편의 전체염기서열을 이용해 blast search를 수행한 결과 *Oryza sativa* putative ADP-glucose pyrophosphorylase subunit SH2 and putative NADPH-dependent reductase A1 genes(OSU70541)과 85%의 상동성을 보였으며, 또한 *Oryza sativa* pyruvate decarboxylase 2 (*pdc2*) gene(OSU38199)과도 90%의 상동성을 보였다 (Fig. 11).

제 4절 고 찰

최초 수행된 RAPD분석의 경우 285개의 primer를 사용하여 증폭시킨 4000개의 DNA 단편들 중 3차까지 재현되는 단편은 없었다. 이는 아마도 MNU처리로 얻어진 식물체의 경우 point mutation이 야기되며, 또 MNU처리 이후 3세대 진전된 식물체를 재료로 함으로 인해 유전적으로 많은 부분에서 회복되었기 때문이 아닌가 생각된다. 그러나, 본 실험에서는 PCR 반응물을 기존의 방법인 agarose gel에 전기영동하고 전개된 band들을 EtBr로 염색하는 대신에 0.6mm 두께의 non-denaturing polyacrylamide gel에 전기영동 하고 전개된 band들은 silver stain법을 이용하여 염색하였다. 이 방법들을 도입한 결과 PCR산물을 1 μ l만 loading 하여도 전개된 모든 band들의 관찰이 가능하였고 sensitive면에서도 뛰어나 agarose gel에서 관찰 할 수 있는 band 수의 2배 가량 효율이 높은 것을 볼 수 있었다. 따라서 RAPD 분석에 이 방법을 도입한다면 소요되는 경비를 줄일 수 있고 또 분석력을 더욱 강화시킬 수 있으리라 사료된다.

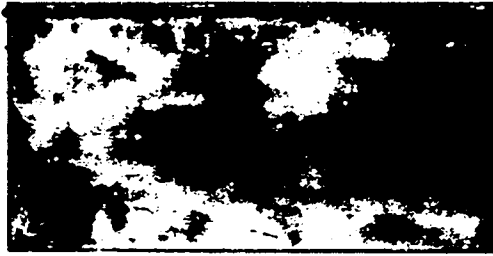


Figure 9. Reverse northern analysis using the control cDNA probes.



Figure 10. Reverse northern analysis using the mutant cDNA probes.

```

GGCTTGGCAC   GCATCATATA   AACTGTACC   GTGCTTGGGA   ATAGATGAAA   GGCTGAAACT   AATAAGGGTA
CAACCGAGAG   CTGCAGGCTT   TGTTCTAGAG   TTGTGATCAG   TGACATCTCT   GCACTGTTGA   TTAGTGCCTA
CCTGGCCATT   TCAGGTTTTG   TCTACATACA   TGCACAGGAA   TCTAGCATAG   CACAATTGCA   ATTTGCAAAT
CTGCATCTTG   TGTTTTGGTT   GGAATGCATG   CCATGCAGAT   GTCTTGCCAA   GAGTTCAAAT   GCAGGTGAAA
TTAAGGGCCT   TGCTGTTTGA   TAAATCAAAT   CGGTACTACT   TCGAATATCA   AGAAGTCACA   TAATGGAATA
CAGTTCTCGA   GACCAGATAT   ATGCAAGGGT   CAAAAGGATG   ATCAAGGTTT   GCCAAAAGTA   CACAGTAAGA
GCACCCGCAA   TGGTAAAGTA   AGGTGCTCTC   TATAAAAACA   TGTACATCTT   AGAATAGACT   AGATTAATAG
TAAACCACCT   CAATAGTATG   TCTACATGGG   TATCTATAGC   TCTCTAATCC   ATTGCTTCGT   TTTCTTTAT
AGACTATCTC   CAGGTTAGTA   GATAGCTTTG   CTCTCTCTCT   TCATTTAATC   TCTTCCAAGT   AGGAAAATAT
GCTGACATGT   ATATCTTATA   GAGAGCCTAT   AGATAACCAT   TGCAGGTGCC   CTAACATCTT   GCAGCAACCT
AGTATTGAAC   ACGCGCTGAA   GTACAGTAAC   ATTTCTGAAT   TCTGACTTTG   CAACTTGATC   ATTAGGCCCC
TCACGGTTTCG   TGTCCGATTG   CATAAGTAAA   GTGATCAAAG   GCGTGAGTAA   TAACATATTT   AGTGTTCGCG
TCCAGTGTGG   CCGGCCAAAG   TAGGCCTCGG   GATCGGTGCG   CGTGAAATTG   TCTTTCTGGA   TAATTTTGAT
CCCTCTCTCT   CTCTCCCTGG   AAAAGAACAG   TTGTGATGAA   CCAGCAAATG   TTAAAGGTTT   AAATAAAAAG
GCTTAGGTTT   TAAAGGTCCA   TTAGTTGGAG   TTGTGTTTGG   AAGGAACTTC   TTATGTGTAC   TCGCCACAG
AATGATGCAA   TGCCAGGCT

```

Figure 11. Sequence of amplified 1069bp fragment using Phy-1 and Phy-31 primer.

피틴산 합성 및 관련 유전자에 대한 marker를 획득하기 위하여 좀더 powerful한 기법인 genomic DNA AFLP를 수행하였다. 그러나 재현이 안되는 RAPD 분석과는 달리 증폭된 4000개의 DNA단편들 중 control과 mutant에 specific한 DNA단편 자체를 얻을 수 없었다. 따라서 RAPD, genomic DNA AFLP분석 결과 본 연구의 경우 DNA 수준에서 control 과 mutant간에 specific한 DNA 단편을 얻는 것은 어려운 것으로 판정되었다.

피틴산 합성 및 해리 유전자에 좀더 근접하기 위하여 DD-RT PCR 및 mRNA-AFLP분석을 실시하였으며, DD-RT PCR분석결과 control에만 존재하는 3개의 단편과 mutant에만 존재하는 1개의 단편을 얻을 수 있었다. 그리고 이들의 단편들을 probe로 하여 northern 분석을 수행한 결과 PCR 결과와 일치하였으며, southern 분석을 수행한 결과 단일 band로 나타나는 것으로 보아 genomic DNA상에 single gene으로 존재하는 것을 알 수 있었다. 따라서, 이들 probe를 저 피틴산 벼 품종 육성에 이용한다면 효율을 더욱 극대화시킬 수 있을 것이다.

마지막으로 *Aspergillus*의 phytase 유전자로부터 작성한 2개(Phy-1, Phy-31)의 primer를 이용하여 일품벼의 genomic DNA로부터 증폭된 1069bp의 단편의 경우 sense 단편은 벼의 NADH-dependent reductase와 90%의 상동성을 가지며 antisense 단편은 ADP-glucose phosphorylase subunit SH2 와 85%의 상동성을 갖는 DNA 단편으로 밝혀졌다. 따라서 이 단편의 경우 새로운 저 피틴산 품종을 유도하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

제 5 절 참 고 문 헌

1. Baucer, D., Mulleir. H., rich. J., redel H., Ahrenkel. b., Waerthoe, P., and Stres, M. 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique(DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21:4272-4280.
2. Daniel, G., Amanda G, F., and Matthias, M. 1997. rational Primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR). *Nucleic Acids Res.* 11:2239-2240.

3. Hong Z., Z. Rong and L. Peng 1996. Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acid Res.* 12:2454-2455.
4. Kikuya, K. 1996. RNA fingerprinting by molecular indexing. *Nucleic Acid Res.* 24:394-395.
5. Liang, P. Pardee A. B. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acid Res.* 21:3269-3275.
6. Ling, P., and Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
7. Peng. L., Lidia. A., and Arthur B. P. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acid Res.* 14:3269-3275.
8. Piddington C.S., C.S. Houston, M. Paloheimo, M. Cantrell, A. Miettinen-Oinonen, H.N. Nalainen and J. Rambosek. 1993. The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (phy) and pH 2.5-optimium acid phosphatase (aph) from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Gene.* 133:55-62.
9. Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie Frijters, Jerina Pt, Jogan Peleman, Martin Kuiper and Marc Zabeau. AFLP:a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 1995, Vol. 23, No.21 4407-4414.

10. Poirier G.M.C., J. Pyati, J.S. Wan and M.G. Erlander. 1997. Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Res.* 4:913-914.
11. Tingey SV, del Tufo JP (1993) Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol* 101:349-352.
12. Torres AM, Weeden NF, Martin A (1993) Linkage among isozyme, RFLP, and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 85:937-945.
13. Tracy Money, Steve Reader, Li Jia Qu, Roy P. Dunford and Gragam Moore. AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1996, Vol. 24, No. 13 2616-2617.

제6장 알레르기를 일으키는 쌀 단백질의 유전자분석 및 저 알레르기 벼의 개발을 위한 기초 연구

제 1 절 서 설

벼의 저장 단백질은 그 용해도에 따라 prolamin, glutelin, albumin, globulin으로 나눌 수 있고 쌀의 저장 단백질중에 과잉 면역반응을 유발하는 성분이 존재한다고 보고 되었다. 이 단백질은 전기영동과 western blotting을 통해 분자량과 등전점이 밝혀졌는데 분자량은 14-16kDa이고 pI 6-8으로 확인되었다. 이러한 곡류 알러젠은 쌀 뿐만 아니라 밀, 대두, 수수등 다양한 곡물에 존재한다고 보고되었다. 특히 밀은 baker's천식을 일으키는 알러젠을 함유하고 있으며, 이 천식은 전형적인 직업병으로서 음식산업에 있어서 중대한 문제로 대두되고 있어 해결 해야 할 시급한 과제로 떠오르고 있다.

Type I 과민반응(hypersensitivity)은 호흡기 또는 소화기 계통을 통해 체내에 유입된 무해한 이 물질에 대하여 체내의 면역체계가 항체의 일종인 IgE를 생산함으로써 수반되는 여러 임상 병리적 현상을 나타내는 질환이다. 문화가 발달한 선진 국가일수록 환자의 수가 증가되는 현상이 보고되면서 현재 이 질환을 일종의 문화병으로 간주하고 있으며 국내에서도 type I 과민반응 증세를 보이는 환자의 수가 급격히 증가하고 있고 따라서 환자의 진료급증에 따른 사회적, 경제적 문제가 서서히 대두되고 있는 실정이다. 한편 식품 알레르기는 음식물의 섭취로 인해 체내에 유입된 알러젠(allergen)에 대하여 대상 환자가 type I과민반응인 아토피성 증상을 유발하는 질환으로서 현재 환자의 수가 꾸준히 증가되고 있으며, 국내에서는 그 임상 통계가 아직 불분명하나 일본, 대만 및 서구 선진 국가등에서 우리의 주식인 쌀에 대하여 식품 알레르기 반응을 나타내는 환자의 수가 점진적으로 보고되고 있다. 쌀

알레르기는 특정 성인뿐만 아니라 젖먹이 후 이유식을 시작하는 유아의 건강에 중요한 발육 저해 요인이 될 수 있으며 따라서 쌀 알레르기에 관한 연구가 활성화 되어야 할 필요성을 제시하여 주고 있다. 모든 아토피성 알레르기에서와 마찬가지로 type I 과민반응에 대한 최선의 치료 방법은 알레르기를 유발하는 식품의 섭취를 피하는 것이며, 쌀 알레르기에서와 같이 이것이 용이하지 않을 경우 알러젠의 함유를 인위적으로 낮춘 기능성 식품을 개발하는 것이 식품 알레르기를 예방하는 가장 좋은 방법이라 할 수 있다.

벼(*Oryza sativa* L.)는 밀, 옥수수과 더불어 세계의 주곡 작물중 하나이며 특히 우리나라를 비롯한 아시아권의 주요 식량원이다. 벼는 총 12쌍의 염색체로 구성되어 있으며 유전자의 크기는 대략 4.3×10^8 bp이다. 벼는 이렇듯 비교적 작은 유전자크기와 함께 다양한 표현 형질을 가지고 있고 약 20만 계통 이상의 풍부한 유전자원이 존재하며 단자엽식물의 연구에 있어서 좋은 model system으로 여겨진다. 대부분의 곡물들처럼 벼도 수분이 된 후 성숙되는 과정에서 탄수화물, 지질, 단백질 등을 저장하는데 건조 중량의 약 50% 정도가 amylose 등의 탄수화물이며 약 8-10% 정도가 저장단백질로 질소원, 황원, 탄소원 등을 축적하게 된다.

벼의 저장단백질은 그 용해도에 따라 prolamins, glutelins, albumins, globulins으로 나눌 수 있다. 산성과 염기성 용액에 녹는 성질을 가지는 glutelin은 전체 저장 단백질중 가장 많은 80%정도를 차지하고 있으며 alcohol에 용해되는 prolamin은 5-15%정도이고 나머지가 수용액과 salt 수용액에 녹는 albumin과 globulin이다. 벼 저장 단백질은 배유에 축적되어지는데 glutelin은 crystalline protein bodies(PBII)에 주로 축적되어지며 prolamin은 spherical protein bodies(PBI)에 축적된다. Albumin과 globulin은 PB에는 저장되지 않고 배유에만 축적된다.

쌀의 저장 단백질중에 과잉 면역반응을 유발하는 성분이 존재한다고 보고되었고, 보리와 밀에서도 이러한 사례가 보고 되었다. 과잉 면역반응을 일으키는 알러젠은 SDS-PAGE에 의해서 분자량이 16kDa이고 단백질 1Mol당 7개의 cysteine을 함유하고 있다는 것이 밝혀졌다. 벼의 allergenic protein의 연구는 저장 단백질의 여러 성분 등을 대상으로 skin test, RAST(radioallergosorbent tests), histamine유리 실험 등을 통해 이루어졌다. Rice

allergenic protein(RAP)은 albumin계 단백질로 anaphylatic 반응을 유도하는 항체의 class 인 immunoglobulin E가 비정상적으로 높아짐으로써 아토피성 피부염을 유발시키는 피부염증이다. 이 아토피성 피부염은 쿠키(cookie), 케익(cake), 국수(noodle), 와인(wine)과 같은 생산물이나 쌀을 계속하여 섭취한 후에 급격하게 발전하게 되고 알러젠의 섭취를 그만두지 않았을 경우 이 환자는 부스럼이나, 가려움증의 원인이 된다. 특히 최근 일본에서 쌀과 연관된 알레르기는 계란 흰자의 알레르기 다음으로 큰 비중을 차지하고 있는 실정이다. 이것은 IgE RAST(radioallergosorbent test)실험을 통해서 증명되었다. 알레르기를 일으키는 알러젠(16kDa)의 특성을 보면 열에 안정하고 끓인 후에도 알레르기를 일으키는 성분이 남아 있어 쌀을 섭취하는 사람들은 불가피하게도 면역학적으로 활성화된 형태의 단백질을 섭취하게 되는 것을 의미한다. 이러한 이유로 hypoallergenic rice의 생산을 위한 연구가 수행되어왔다. Hypoallergenic rice는 외관상 정상적인 rice와 유사하지만 protease의 첨가로 proteolysis를 일으켜 rice 단백질의 주요 알러젠을 제거하는 효소반응을 기초로하고 있다. 뿐만아니라 rice grains에 직접 효소처리를 하는 방법을 이용했는데 이것은 쌀의 섭취가 grains의 형태로 이루어지기 때문이다. 이렇게 획득된 hypoallergenic rice은 전기영동 분석을 통해 주요 알러젠을 함유하고 있는 salt soluble protein fraction이 거의 완벽하게 제거되었다. 이런 특이적 proteolysis는 salt soluble protein rice seed cell의 cytosol에 맨 처음 존재하기 때문에 가능한 것이었다. 영양학적으로 정상 쌀과 아무런 차이가 없었고 쌀과 연관된 아토피성 피부염을 일으키는 환자를 대상으로 임상학적으로 hypoallergenic rice의 섭취가 15주 동안 이루어졌는데 환자의 약 90% 이상이 효과를 보였다. 1982년 Izumi 등이 RAP(Rice Allergenic Protein)를 정제하여 아미노산 말단의 아미노산 염기 서열을 결정하였고 이를 기초로 하여 제작한 핵산 탐침으로 Nipponbare의 성숙한 종자 cDNA library에서 RAP유전자를 분리하여 이들의 염기 서열 분석이 이루어졌다. 이 결과 ORF(Open Reading Frame)으로 추정되는 486개의 핵산 염기 서열을 밝혀냈으며 162개의 아미노산 서열로 구성되었다고 보고되었다. 또한 보리와 밀의 α -amylase/trypsin inhibitor family에서 전형적으로 나타나는 10개의 cysteine잔기를 가지고 있었다.

그 후 지금까지 RAP유전자는 cDNA clone 3종과 genomic clone 2종이 밝혀졌으며, RAP cDNA clone간의 유사성 분석을 통해 핵산 염기 서열 수준에서는 80%이상, 아미노산 염기 서열 수준에서는 70%이상의 유사성을 보여 그들 서로간의 높은 상관 관계가 있음이 밝혀졌다. 한편 genomic DNA염기 서열 분석을 통한 ORF의 5' 상위 부위의 염기 서열의 유사성 분석을 시행한 결과 벼의 glutelin promoter의 conserved sequence (TGCAAAA)와 유사한 sequence (ATGCAAAA)가 존재한다고 보고되었다. Northern blotting을 통해 알아 본 유전자의 발현시기는 수정된 후 종자가 성숙하는 기간이었으며, 15-20일 사이에 가장 많은 양이 발현되었다. 또한 미성숙 종자를 제외한 다른 조직에서는 발현되지 않았다.

본 연구에서는 화학적 mutagen으로 처리된 일품벼의 돌연변이 종자들과 33개의 한국산 쌀 종자들로 부터 현재 16KDa 단백질로 알려진 쌀 알러젠의 함량이 대폭 저하된 저 알레르기 쌀 종자의 선별, 획득과 cereal grains(보리, 밀, 수수, 메밀, 콩)의 단백질 함량 분포조사를 위해 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), SDS-PAGE, western blotting방법을 통하여 기능성 식품으로서의 저 알레르기 쌀 종자를 개발하는 동시에 쌀 종자로부터 cDNA library를 제작하여 rice allergen 특이적 polyclonal 항체를 사용하여 rice allergen cDNA clones을 획득하고, rice allergen cDNA를 *E. coli*에서 유전자 재조합 단백질로 isopropylthio- β -D-galactoside(IPTG)을 이용하여 발현을 유도하여 알러젠의 유전자 혹은 생화학적 특성 분석을 시도하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 실험 재료

가. 시료

1995년 일품벼의 수정란에 돌연변이 유기제인 N-methylnitrosourea(MNU)를 시간대별로 처리하여 파종하여 얻은 약 약 10,000계통의 돌연변이체(M_2 seeds)를 시료로 이용하였다.

2. 실험방법

가. 16kDa rice allergenic protein의 분리 및 정제

일품벼 현미의 저장 단백질로부터 globulin을 추출하여 과잉면역반응(hypersensitivity)을 일으키는 16kDa의 단백질을 Prep-cell kit(Biorad, Richmond, CA)을 이용하여 분리하였고 phosphate buffered saline(PBS)으로 투석하여 획득하였다.

나. Rat polyclonal 항체의 생산

정제된 16kDa protein 1mg을 Freund's complete adjuvant (Sigma Co., St. Louise, Mo)와 혼합하여 쥐(Fisher strain, Female)의 복강에 주사하였다. 2번의 연속적인 booster injection이 2주마다 수행되었으며 Freund's incomplete adjuvant (Sigma Co.)가 booster injection을 위해 사용되었다. 마지막 injection 일주일 후에 쥐의 peripheral blood로부터 혈청을 분리하였다.

다. Salt-soluble rice proein의 분리

일품벼 현미로부터 각각 5개의 seeds(0.1g)을 취하여 가루로 만들고 지방 성분을 제거하기 위해서 750 μ l cold acetone을 넣은 후 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 방치해 두었다. 그후 원심분리(4 $^{\circ}$ C, 10min, 12,000rpm)을 이용하여 상등액을 제거한 다음 말린 후 400 μ l phosphate buffered saline(PBS)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. 그 다음 원심분리를 이용하여 단백질이 포함되어 있는 상등액을 얻음으로서 total protein을 추출하였다.

라. ELISA을 이용한 저 알레르기 쌀 종자의 검색

상기의 polyclonal 항체와 salt-soluble 쌀 단백질을 가지고 ELISA방법을 이용하여 coating buffer(0.1M carbonate pH 9.6) 25 μ l와 항원 25 μ l을 coating하였다. 1차 항체는 1:100으로 희석하여 50 μ l를 첨가하고 2차 항체 (goat anti-rat IgG conjugated with alkaline phosphate)(Caltag)는 1:2,000으로 희석하여 50 μ l를 첨가한 다음 4-Nitrophenyl phosphate (PNPP) 50 μ l를 첨가하여 405nm에서 ELISA Reader로 반응을 측정함으로써 저 알레르기 쌀 종자를 검색하였다.

마. ELISA을 이용한 rice protein의 통계학적 분석

33개의 종자(추정벼, 수원413호, 용주벼, 밀양23호, 대안, 용문, 안중, 화성, 진부23호, 낙동, 동진, 진미, 삼천, 팔공, 일품, 향남, 다산, 남천, 안산, 장성, 화천찰벼, 오대, 대청, 둔내, 통일, 향미1호, 진흥, 일미, 삼강, 농안, 주안, 금오, 소백)들을 위의 ELISA방법과 동일하게 실시한 다음 낙동(a*), 안산(b*), 화천찰벼(c*)을 기준으로 하여 a*:a, b*:b, c*:c 들을 비교하였다(P < 0.05).

바. SDS-PAGE와 western blotting을 통한 반응 특이성 분석

Total protein을 정량한 다음 well당 5 μ g이 되도록 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하여 단백질의 함량 분포를 조사한 다음 PVDF membrane(Bio-Rad)으로 transfer하고 blocking buffer(casein 0.2%/Tween-20 0.1% in PBS)를 이용하여 1시간 동안 blocking하였고 TBS-Tween20(0.1%)을 이용하여 5분 씩 3번 세척하였다. 1차 항체는 rice polyclonal 항체(anti-16kDa allergen protein)를 1:500으로 희석하여 이용하였고 2차 항체(goat anti -rat IgG conjugated with alkaline phosphatase)(Caltag)는 1:2,000으로 희석하여 첨가한 후에 5-bromo-4-chloro- 3-indolyl phosphate(BCIP)/Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)(Amersham)를 이용하여 polyclonal 항체와 salt-soluble rice protein과의 반응 특이성을 분석하였다.

사. Rice cDNA library의 제작

Messenger RNA(mRNA)는 mRNA isolation kit(In vitrogen, San Diego, USA)을 사용하여 한국 쌀 종자로부터 분리한 후 λ UniZap vector kit (Stratagene, San Diego, USA)와 in vitro packing extract (Beringer Mannheim Biochemicals(BMB), Germany)을 이용하여 rice cDNA library를 제작하였다.

아. Positive clones의 분리

10mM MgSO₄(O.D.₆₀₀=1.0)에 resuspension된 XL-Blue MRF ' 600 μ l와 약 25,000개의 phages를 섞은 다음 37 $^{\circ}$ C incubator에서 15분 동안 배양한 후 top agar 8ml을 혼합물에 첨가하고 LB plate(150X15mm)에 부었다. LB plate는 palques가 보일 때 까지 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양한 후 10mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)에 적신 nitrocellulose filter를

덮어 32°C incubator에서 over-night 배양하였다. Plate에서 filter를 제거한 후 PBS로 씻어준 다음 0.05% Tween-20을 포함하고 있는 PBS(PBST)에 1% bovine serum albumin(BSA)(Sigma Co.)를 녹여 room temperature(RT)에서 1시간 동안 blocking하였다. Filter를 PBST로 3번 씻어준 후 미리 RT에서 2시간 동안 XL-Blue MRF' lysate로 흡착시킨 rat polyclonal 항체를 가지고 배양하였고 다시 filter를 PBST로 3번 씻어준 다음 항체, goat anti-rat IgG conjugated with alkaline phosphatase(AP)(Sigma Co.)를 1% BSA에 1:2,000으로 희석한 후 filter에 첨가하여 RT에서 1시간 동안 배양하였다. BCIP/NBT(Amersham)기질을 사용하여 반응 시킨 후 dH₂O로 반응을 정지시켰다. 더 확실한 positive clone을 얻기 위해 1차 screening으로 얻은 9개의 positive plaque를 pasteur pipette을 이용하여 LB plate로부터 거두어 40µl chloroform을 포함하고 있는 1ml SM buffer에 resuspension하였다.

자. Recombinant phagemids의 획득

2차 검색후 *in vivo* excision에 의해서 phagemids를 9개의 positive λ phage clone들로부터 확인하였다. 9개의 positive λ phage 50µl를 각각 100µl XL-1 Blue MRF' cells (Stratagene)(O.D.₆₀₀=1.0)과 1µl R408 helper phage(> 10¹¹pfu/ml)와 혼합하여 37°C shaking incubator에서 15분 동안 배양한 후 3ml 2X YT media를 각 tube에 가하고 다시 37°C shaking incubator에서 3시간 동안 배양하였다. Culture를 70°C에서 20분 동안 배양하여 활성을 정지시키고 원심분리하여 상등액을 얻었다. Phagemids가 포함되어있는 상등액을 XL-1 Blue MRF' 과 혼합하여 37°C incubator에서 15분 동안 배양시키고 혼합물은 LB/amp plate(50µg/ml)에 spreading하여 37°C에서 overnight 배양하였다. 각 LB/amp plate로부터 *E. coli* colony를 무작위적으로 선택하여 Qiagen Miniprep kit으로 plasmids를 분리하고 *Xho*I/*Eco*RI(BMB)효소로 처리한 후 전기영동으로 cDNA insert의 크기를 확인하였다.

차. Immunoblot 분석

E. coli colonies는 O.D.₆₀₀=0.8이 될 때까지 2ml의 LB/amp media에 키운 후 recombinant rice allergenic 단백질이 발현되도록 1mM IPTG를 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 그후 초원심분리하여 cell pellet을 SDS-PAGE sample buffer 200 μ l에 resuspension하여 5분 동안 끓인 후 세포내 단백질을 12% SDS-PAGE로 분리하였다.

Gel 상에 크기별로 분리되어 있는 단백질을 nitrocellulose membrane(Amersham)으로 transfer한 후 RT에서 1시간 동안 1% BSA를 가한 PBST에 blocking 되었고 XL-1 Blue MRF ' cells lysate에 흡착된 immunized rat 혈청이나 normal rat 혈청을 첨가 하였다. PBST로 3번 씻어주고 alkaline phosphatase(AP)가 접합된 goat anti- rat IgG를 첨가한 후 BCIP/NBT 기질을 이용하여 반응시킨 다음 dH₂O로 씻어서 반응을 정지 시켰다.

카. Automatic DNA sequencing

Immunoblot에서 positive signal을 보여주는 5개의 rice cDNA clones은 DNA sequencing 분석을 위해서 선택되었다. Plasmids는 Qiagen Miniprep kit을 사용하여 분리하였고 polymerase chain reaction(PCR)은 cy5TM AutoCycleTM Sequencing Kit (Pharmacia Biotech)을 이용하여 수행되었다. Sequencing gel은 Long RangerTM Gel solution(FMC Corp.)를 이용하여 준비되었고 automatic DNA sequencing은 ALFexpress Sequencers(Pharmacia Biotech)을 이용하여 진행되었다.

타. Rice scFV antibody library의 제작

정제된 16kDa protein의 1mg이 Freund's complete adjuvant (Sigma Co., St. Louise, Mo)와 희석되었고 쥐(Fisher strain, Female)의 복강에 주사되었다. 2번의 연속적인 booster

injection이 2주마다 수행되었으며 Freund's incomplete adjuvant (Sigma Co.)가 마지막 booster injection을 위해 사용되었다. 마지막 injection 일주일 후에 쥐로부터 spleen을 분리하였으며, Messenger RNA(mRNA)는 high pure RNA isolation kit(Beringer Mannheim Biochemicals(BMB), Germany) 사용하여 분리하였고, 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR(Beringer Mannheim Biochemicals(BMB), Germany)을 이용하여 cDNA를 만들었다. 이를 Pharmacia biotech의 Recombinant Phage antibody system(Mouse ScFv, Expression, and Detection Modules kit)을 이용하여 mouse ScFv antibody library을 제작하였다.

파. 항원 특이적 Recombinant Phage의 검색

정제된 16kDa protein을 $100\mu\text{g} / \text{ml}$ 으로 coating 한 후 TBS buffer에 3%가 되도록 bovine serum albumin(BSA)(Sigma Co.)를 녹여 37°C 에서 1시간 동안 blocking하였다. TB ST(0.1%)으로 3번 씻어준 후 ScFv phage antibody library 3×10^{10} 을 첨가하여 37°C 에서 2시간 반응시켰다. TBST(0.1%)으로 5번 씻어준 후 항원에 특이적으로 결합한 phage만을 분리하기 위하여 0.1M HCl(pH 2.2: $1\text{mg}/\text{ml}$ BSA)을 첨가한후 약 7분정도 반응시킨 후 2M Tris base로 중화하였다. 배양된 TGI *E. coli*을 원심분리하여 cell pellet을 10mM MgSO_4 로 0. $D_{600}=1.5-2.0$ 정도로 되도록 희석한 후 분리된 phage를 감염시키고 37°C 에서 30분간 현탁 배양한 후 titer를 시행하고 그후 2X-YT media를 첨가하여 37°C 에서 1시간동안 현탁 배양하였다. 배양액에 $100\mu\text{g} / \text{ml}$ 로 ampicilin을 첨가, 4×10^{10} pfu정도의 M13 K07(helper phage)를 가한 후 37°C 에서 1시간동안 현탁 배양하였다. 배양액에 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 kanamycin을 가하고 30°C 에서 밤새 현탁 배양하였다.

위의 과정을 5회 반복하여 scFv phage를 검색하였다.

하. ELISA을 통한 Positive phage의 선택

5차 검색시 항원에서 분리된 phage의 titer plate로부터 colony를 2X YT media에 접종하여

37℃에서 약 2-3시간 현탁배양한 후 배양액에 100 μ g/ml로 ampicilin을 가하고, 4 \times 10¹⁰ pfu 정도의 M13K07(helper phage)를 가한 후 37℃에서 1시간동안 현탁배양한다. 그리고 배양액에 50 μ g/ml로 kanamycin을 가하고 30℃에서 밤새 현탁배양한 후 1/4의 PEG/NaCl로 phage을 침전시킨 후 TBS buffer로 현탁하여 phage를 준비한다. 정제된 16kDa protein을 100 μ g / ml 으로 coating 한 후 TBS buffer에 3%가 되도록 bovine serum albumin(BSA)(Sigma Co.)를 녹여 37℃에서 1시간 동안 blocking하였다. TBST(0.1%)으로 3번 씻어준 후 phage 을 첨가하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. TBST(0.1%)으로 3번 씻어준 후 HRP/anti-M13 conjugate antibody를 1:4000으로 희석하여 반응시킨후 TBST(0.1%)으로 3번 씻고 기질을 넣어 반응을 확인하였다.

제 3 절 결 과

1. 쌀 cDNA library의 제작 및 쌀알러젠 단백질의 분리

가. 16kDa rice allergenic protein의 분리 및 정제

일품벼 현미의 저장 단백질로부터 globulin을 추출하여 16kDa의 단백질을 Prep-cell kit을 이용하여 분리하였다. 이렇게 분리 정제된 16kDa 단백질은 western blot등의 실험에 이용된 polyclonal 항체를 생산하기 위해서 rat에 두어됨으로써 16kDa 쌀 알러젠 단백질과 특이적으로 반응하는 항체를 얻을 수 있었다(그림 1).

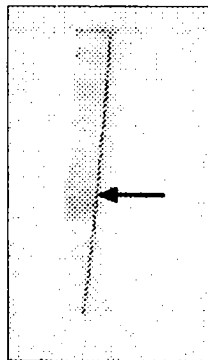


Figure 1. Generation of rat polyclonal antibody. Arrow indicates specific binding of a polyclonal antibody to 16kDa rice allergenic protein.

나. 저알레르기 쌀종자의 검색

1). Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

약 2,400 이삭 (약 15,000 seeds)의 일품벼 들연변이체를 연구 재료로 하여 한 이삭당 다섯 개의 seeds를 무작위적으로 선택하여 각각의 seed로부터 cold acetone과 NaCl (0.5M) 용액을 사용하여 salt-soluble 쌀단백질을 추출하였다. Polyclonal 항체와 salt-soluble 쌀단백질을 가지고 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법을 이용하여 1차항체는 1:100으로 희석하여 50 μ l를 첨가하고 2차항체(goat anti-rat IgG conjugated with alkaline phosphatase)(Caltag)는 1:2,000으로 희석하여 50 μ l를 첨가 한 다음, 기질(PNPP) 50 μ l를 첨가하여 405nm에서 ELISA Reader로 반응을 측정함으로써 기능성 식품으로서의 저 알레르기 쌀종자를 개발하기 위한 검색을 시도하였다(Table 1).

2). SDS-PAGE analysis

최종선발된 45개의 쌀 종자들을 well당 5 μ l씩 12% SDS-PAGE을 수행하여 쌀 종자들의 단백질 함량 분포를 조사하였다(그림 2).

3). Western blot을 이용한 polyclonal 항체의 반응 특이성 분석

Polyclonal 항체의 항원 반응 특이성을 확인하기 위하여 쌀 globulin 단백질을 12% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 부착하여 western blot을 시행하였다 (Table 2).

Table 1. ELISA screening of I1-Poom LAP(Low-Allergen Protein).

plant	No	1차 검색 갯수	2차 검색 갯수	비 고
CM 1	1-10	none	none	5 종자/이삭
	11-20	5	1	"
	21-30	5	none	"
	31-40	none	none	"
	41-	none	none	"
CM 4	1-10	none	none	"
	11-20	15	3	"
	21-30	6	none	"
	31-40	9	4	"
	41	1	none	"
CM 5	1-10	20	3	"
	11-20	21	6	"
	21-30	14	9	"
	31-40	10	1	"
	41-42	2	none	"
합	계	108	27	

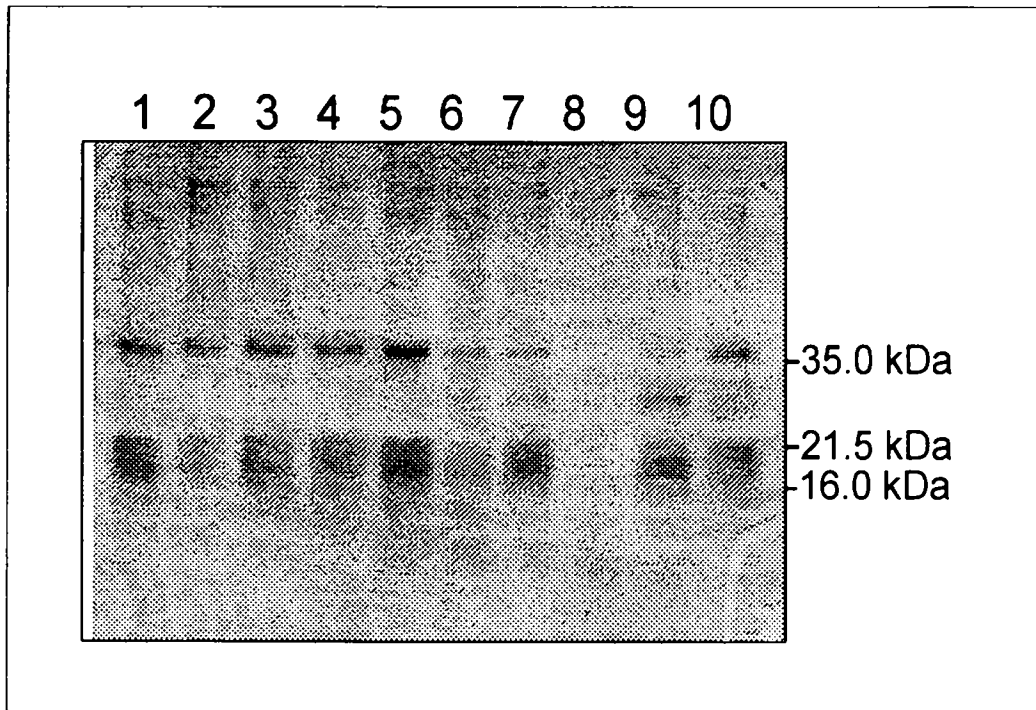


Figure 2. Analysis of mutant rice by SDS-PAGE. The proteins were separated 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue dye. Lane 8 showed mutant rice.

Table 2. Analysis of LAP(Low-allergenic protein) by SDS-PAGE and immunoblot

	NO(종자)	1차 검색	2차 검색	비 고
SDS-PAGE	225	69	53	5종자/이삭
Western blot	225	42	45	5종자/이삭

다. 쌀 cDNA library의 제작

조생종 쌀 종자 (DAF 16 - 20)의 이삭으로부터 messenger RNA는 mRNA isolation kit을 사용하여 분리하였고 Stratagene사의 UniZAP λ vector와 *in vitro* packaging kit를 사용하여 rice cDNA library를 제작하였으며 제작된 cDNA library의 크기는 4.5×10^5 였다. 이 rice cDNA library는 앞으로 rice allergenic protein의 유전자 분석에 유용히 활용될 것이다.

2. 쌀 알러젠의 유전자 분석 및 알레르기 쌀 종자의 검색

가. 저 알레르기 쌀 종자의 검색

1차년도에서 검색된 45개의 저 알레르기 기능성 쌀 종자를 봄에 파종한 후 가을에 추수하여 한 이삭당 무작위적으로 5개의 종자를 선택하고 salt-soluble 단백질을 분리한 후 12% SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) 및 western blot을 수행하여 2차 저 알레르기 쌀 종자를 검색하였다. Western blotting은 SDS-PAGE를 수행한 다음 이것을 60V에서 2시간 동안 PVDF membrane(Bio-Rad)으로 transfer하였다. Blocking buffer(3% skimmed milk in PBS)를 이용하여 blocking을 1시간 한 다음 PBS-Tween20(0.05%)을 가지고 5분 씩 3번 씻어 주었으며, 1차 항체는 rat anti-16kDa allergen protein 혈청을 1:100으로 희석하여 사용하였고 2차 항체는 (goat-anti-Rat IgG conjugated with alkaline phosphatase)(Caltag)는 1:2000으로 희석하여 사용하였다. 이와 같은 동일한 방법으로 두 번에 걸쳐 실시하였고 이렇게하여 polyclonal 항체의 반응 특이성을 분석하였다.(Table 3).

Table 3. Analysis of LAP by 12% SDS-PAGE and western blot.

	NO(이삭)	1차 검색(종자)	2차 검색(종자)	비 고
SDS-PAGE	45	20	15	5종자/이삭
Western blot	45	21	15	5종자/이삭

나. 쌀알러젠의 유전자 분석

1차년도에서 제작된 rice cDNA library를 rice allergen 특이적 polyclonal 항체를 사용하여 검색하였다. 우선 약 60,000개의 λ virus를 plaque assay를 통하여 검색한 결과 항체와 양성반응을 나타내는 10개의 rice allergen cDNA λ phage clone을 일차적으로 획득하였다. 이 phage clone들을 XL-1 Blue *E. coli*에 감염하여 2차 plaque assay를 행하여 9개의 phage clone들을 재차 선별하였으며, R408 helper phage를 이용하여 in vivo excision을 행함으로써 rice cDNA clone을 가지고 있는 plasmid clone들을 획득하였다. 이 plasmid들을 제한효소 (*Xho I/Eco RI*)으로 처리하여 rice cDNA insert의 크기를 분석한 결과 약 500 - 700 bp의 각기 다른 유전자 크기를 나타냈다 (그림 3).

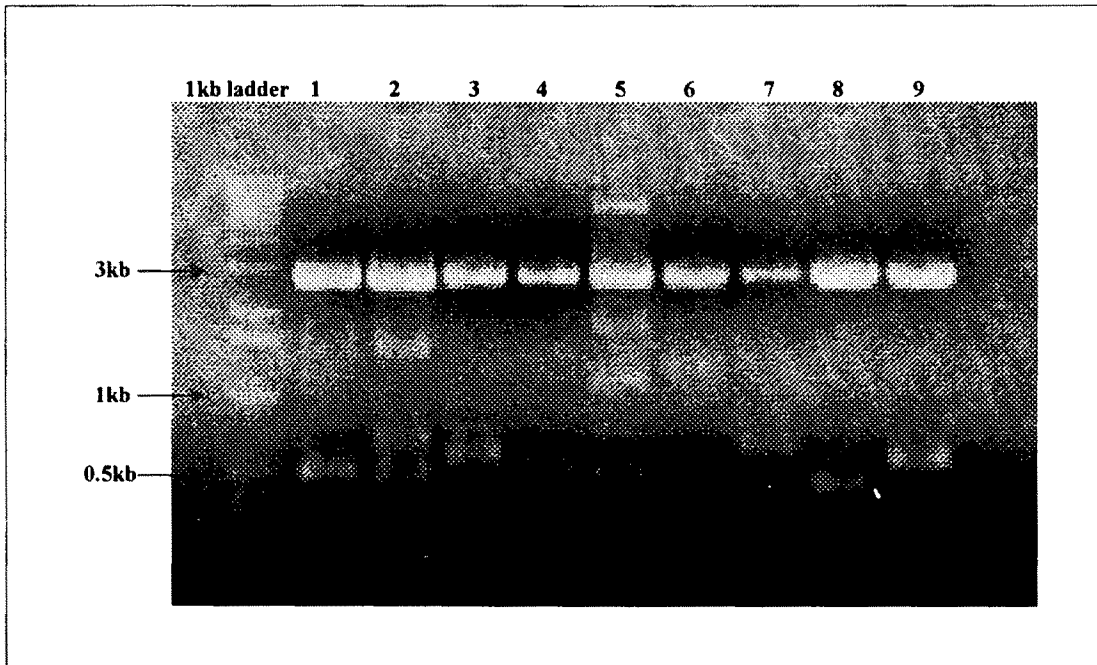


Figure 3. Identification of cDNA inserts by 1.2% agarose gel electrophoresis. After the second round of screening, phagemids were rescued by *in vivo* excision using R408 helper phage. Phagemids were isolated from overnight *E. coli* culture using Qiagen Miniprep kit and treated with *Xho* I and *Eco* RI in order to identify the size of cDNA inserts.

본 실험에서는 쌀 종자의 알러젠 함량이 대폭 저하된 기능성 식품을 개발하기 위해서 1년차 때 최종적으로 선별한 45종자를 파종, 수확하여 12% SDS-PAGE와 western blot을 이용하여 검색을 수행하였다. 그림 6과 그림 7에서 보여주고 있는 것 처럼 1차년도 결과 검색된 45개의 쌀종자중 약 20개 종자들만이 주요 알러젠 단백질인 16kDa의 단백질이 낮게 분포하고 있다는 결과를 얻었다. 이를 다시 확인하기 위해서 동일한 방법으로 실험을 재실시한 결과 최종적으로 15개의 종자를 얻을 수가 있었다. 이 15개의 종자는 3년차때 행하여질 실험을 위해서 쌀눈이 있는 반알들을 moist filter paper에 뿌려 파종을 위한 작업을 수행하였다.

3. 쌀알러젠의 유전자 조작 및 저알레르기 쌀종자의 검색

가. 한국산 벼품종들의 쌀알러젠 단백질 분포 조사

1). SDS-PAGE와 western blot을 통한 검색

33가지의 벼품종 (추청, 수원 413호, 용주, 밀양 23호, 대안, 용문, 안중, 화성, 진부 23호, 낙동, 동진, 진미, 삼천, 팔공, 일품, 향남, 다산, 남천, 안산, 장성, 화천찰벼, 오대, 대청, 둔내, 통일, 향미1호, 진홍, 일미, 삼강, 농안, 주안, 금오, 소백벼)로부터 각각 5개의 seeds(0.1g)를 취득하여 가루로 만들고 지방성분을 제거하기 위해서 750 μ l cold acetone을 넣은 후 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 방치해 두었다. 그 후 원심분리(4 $^{\circ}$ C, for 10min, 12000rpm)을 이용하여 상등액을 제거한 다음 말린 후 400 μ l PBS를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 하였다. 그 후 원심분리를 이용하여 단백질이 포함되어있는 상등액을 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

이렇게 확보한 단백질을 가지고 단백질 정량을 한 후 well당 5 μ g씩 12% SDS-PAGE를 수행하였다. SDS-PAGE를 수행한 다음 이것을 60V에서 2시간 동안 PVDF membrane(Bio-Rad)으로 transfer하였고 blocking buffer(casein 0.2%+Tween-20 0.1% in TBS)를 이용하여 1시간 동안 anblocking한 다음 TBS-Tween20(0.1%)을 가지고 5분 씩 3번 씻어주었다. 1차 항체는 rice

polyclonal 항체(α -16kDa allergen protein)을 1:500으로 희석하여 이용하였고 2차 항체 (goat-anti-rat IgG conjugated with alkaline phosphatase)는 1:2000으로 희석하여 첨가한 후 polyclonal 항체의 반응 특이성을 분석함으로써 한국산 벼 품종들의 쌀알러젠 단백질 분포를 조사하였다. 동일한 방법으로 3차에 걸쳐 검색을 하였다(Table 4).

Table 4. Analysis of Korean cultivars by SDS-PAGE and western blot.

	1차 검색(종자)	2차 검색(종자)	3차 검색(종자)	비고
SDS-PAGE	5	7	3	5종자/이삭
Western-blot	3	5	3	5종자/이삭

2). 한국산 벼 품종들의 통계학적 유의성 검증

ELISA를 통하여 벼 품종들이 rice rat polyclonal 항체와의 특이성을 조사하였다. 이것을 토대로하여 재료 및 방법에서 기술한 것 처럼 낙동(a*), 안산(b*), 화천찰벼(c*)를 기준으로 하여 비교함으로써 통계학적 유의성을 검증하였다(그림 4).

나. 쌀 알러젠의 유전자 및 생화학적 기능 분석

1). 유전자재조합 rice allergenic 단백질의 발현

2차년도에서 획득된 rice allergen cDNA를 대장균에서 유전자재조합 단백질로 IPTG를 이용하여 발현을 유도하였다. 9개의 clone중 5개가 유전자재조합 단백질을 생산하였으며 그 크

기는 약 14 - 17 kDa 정도로 clone마다 약간씩 차이를 보였다. 이 유전자재조합 단백질들은 western blot상에서 항-16kDa 혈청과도 뚜렷한 반응을 보였다 (그림 5).

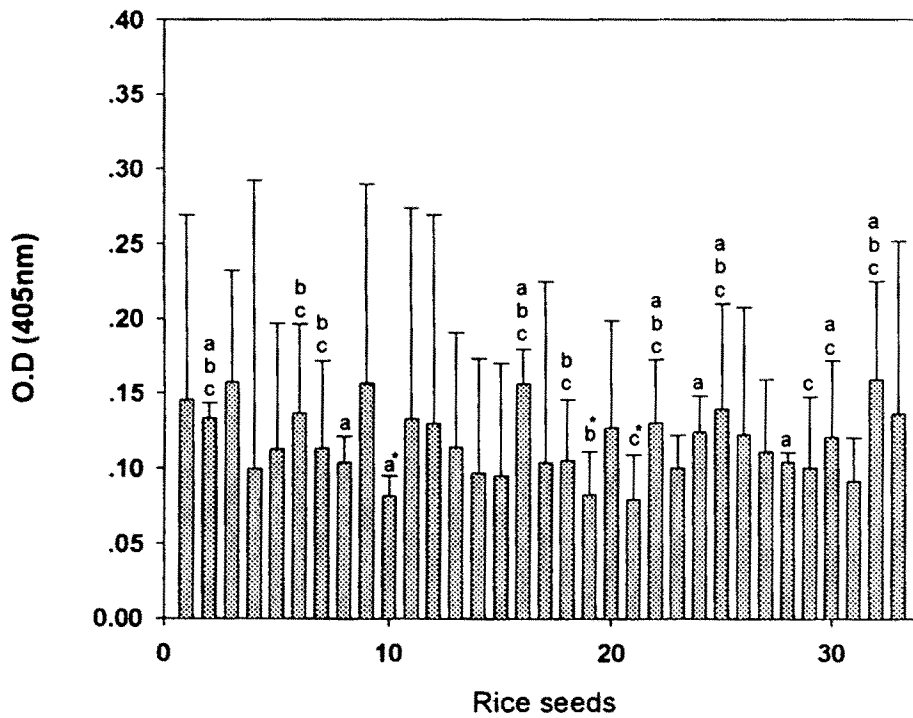


Figure 4. Statistical verification of korean cultivars.

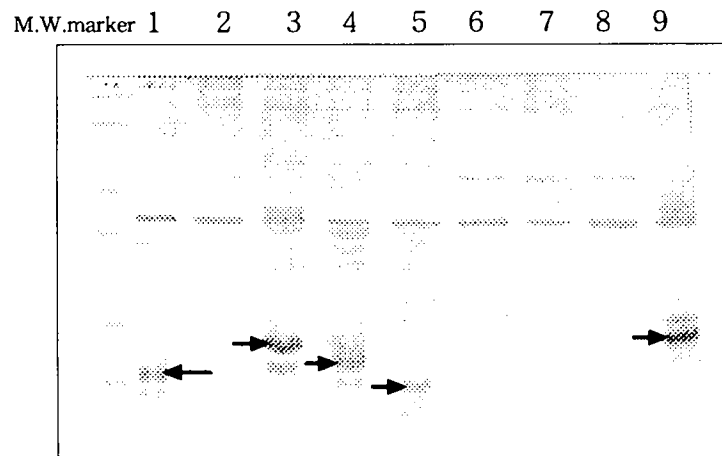


Figure 5. Analysis of recombinant rice allergenic protein by immunoblot. For immunoblot, the nitrocellulose membrane was incubated with an immunized rat sera. Arrows indicate presence of recombinant rice allergenic proteins.

2). Rice cDNA clone의 유전자 염기 배열 조사

상기의 실험결과 도출된 5개 rice cDNA clone의 염기배열을 분석하기위해 automatic DNA sequencing을 통하여 유전자의 염기 배열을 분석하였고(그림 6, 7)이 분리된 5개의 rice cDNA clone과 RA5b, RA14b-c의 DNA sequence와 amino acids sequecne의 homology를 비교하였다(Table 5, 6).

```

1                               *                               60
RA5b  cgagctgcaacaaaaataatggcttccaacaaggtagtgttctcagtggtgcttctcgccg

61                               120
RA5b  tcgtctccgtgctcgcgggcgacggcgaccatggcggagtaccaccaccaagaccaggtgg
RAK1  .....
RAK2  -----
RAK3  .....
RAK4  .....

121                               180
RA5b  tctacaccccgccccgctctgtcagccaggaatgggctaccgatgtaccgctccgc
RAK1  .....
RAK2  -----
RAK3  .....-----
RAK4  .....

181                               240
RA5b  gttgccgggcggttggtgaagcgccagtgcgctcggccgtggcacggctgctgccgcCGAGC
RAK1  .....C-----C--C-----
RAK2  -----
RAK3  -----G-----
RAK4  .....-----A-----A

241                               300
RA5b  aggtccggcgagactgctgccggcagctcgccgcdcgtcgacgacagctggtgcaggtgcg
RAK1  -----
RAK2  -----

```

RAK3 -----

RAK4 -----

301

360

RA5b aggcgatcagccacatgctgggaggcatctacaggagctcggcgcccccgatgtcgggc

RAK1 -----

RAK2 -----

RAK3 -----

RAK4 -----

361

420

RA5b accccatgtccgaggtgttccgcggctgccggagaggggacttggagcgcgcggcggcga

RAK1 -----

RAK2 -----

RAK3 -----

RAK4 -----

421

480

RA5b gcctcccggcggttctgcaacgtggacatccccaacggcggaggtggtgtctgctactggc

RAK1 -----

RAK2 -----

RAK3 -----

RAK4 -----

481

**

540

RA5b ctggcgagat.tggctactagctaggctactgtagctagctgtgcatgtatgatggtgtg

RAK1 .-----C-----.....

RAK2 .-----

RAK3 -----

RAK4 .-----

541 600

RA5b GtgtgggttactaaaatAAat.agtggttttccttttggttgggaagcatatgtgtggggaata

RAK1 ...-----T-----

RAK2 ...-----

RAK3 ...-----C-----

RAK4 ..-----

601

RA5b aatgatgaactccgatgttcc.ctcgtgcc.....

RAK1 -----T---TATAAATCTTGATGATTCGCTAAAAAAAAA

RAK2 -----AAAAAAAAAAAAAAAA.....

RAK3 -----.....

RAK4 -----TCTTGATGATTCGCTAGCTAAAAAAAAAAAAAAAA

(A)

1

50

RA5b MASNKVVFVSVLLAVVSVLAATATMAEYHHQDQVVYTPAPLCQPGMGYPM

RAK1P-----

RAK2-----RG-----

RAK3A-----

RAK4P-----

51

100

RA5b YPLPRCRAIVKRQCVGRGTAAAAEQVRRDCCRQLAAVDDSWCRCEAISHM

RAK1P-----


```

RAK2  -R-----P-----S-----
RAK3  -P-----A-----
RAK4  .....-----L--N-----
      101                               150
RA5b  LGGIYRELGAPDVGHMSEVFRGCRRGDLERAAASLPAFCNVDIPNGGGG
RAK1  -----
RAK2  -----
RAK3  ---T-----
RAK4  ---T-----
      151
RA5b  VCYWLARSGY
RAK1  -----
RAK2  -----
RAK3  -----
RAK4  -----

```

(B)

Figure 6. Comparison of nucleotide(A) and amino acid(B) sequences between RA5b and RAK1-4. (*: Start codon, **: Stop codon)

	1	*	60
RA14b	CAGAGCGGCAGAGAAAAGATTTTCTGCAAACAAAAAGCC <u>ATGGCTTCCAACAAGGTAGTGT</u>		
RA14c	G		
	61		120
RA14b	TCTCGGCGTTGCTCCTCATCATCGTCTCCGTGCTCGCCGCGACGGGACCCATGGCGGACC		
RA14c	GCACGAG-----C-----G-----		
RAK5	---CA-		
	121		180
RA14b	ACCACAAAGACCAGGTGGTGTACAGCCTCGGCGAGCGTTGTCAGCCAGGAATGGGCTACC		
RA14c	-----		
RAK5	GAGCTCGT-C-G-AT-----		
	181		240
RA14b	CGATGTA CT CGCTGCCACGCTGCCGGGCGGTGGTGAAGCGCCAGTGCCTG.GCCACGGCG		
RA14c	-----G-----		
RAK5	-----		
	241		300
RA14b	CACCCGGCGGCG.CGTGGAAACGAGCAACTCCGGCAGGACTGCTGCCGGCAGCTCGCCGC		
RA14c	-----C-----		
RAK5	-----		
	301		360
RA14b	GGTCGACGACAGTTGGTGCAGGTGCTCGGCGCTCAACCACATGGTTGGAGGCATCTACAG		
RA14c	-----C-----		
RAK5	-----A-----		
	361		420
RA14b	GGAGCTCGGCGCCACCGATGTTGGGCACCCCATGGCCGAGGTGTTCCCGGCTGCCGGAG		

```

RA14c -----
RAK5 -----
      421                                     480
RA14b AGGGGACTTGGAGCGCGCGGCGGAGCCTCCCGGCGTTCTGCAACGTGGACATCCCCAA
RA14c -----
RAK5 -----
      481                                     540
RA14b TGGGACAGGTGGTGTCTGCTACTGGCTA.GGTTAT...CCTAGGACCCCGAGAACTGGTC
RA14c -----,-----ACC-----
RAK5 -----A-----...-----
      541 **                                     600
RA14b ACTAGGCTACTAAAGCTAGCTGTGTGTATGACTCTGTGGGGTTGCTAAATAACTAGTGCT
RA14c -----,-----
RAK5 -----A-----T-----
      601                                     660
RA14b TTCATTTGTCAGGAAGCATATATACATATGGTGAATAAATGCTCG.TGCC
RA14c -----ATGA.ACCTCAATGTTCTT
RAK5 -----AT-----G
      661
RA14b
RA14C ACCTCGTCCC
RAK5 -ATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

(A)

```

1
RA14b MASNKVVFSALLLIIVSILAATGPMADHHKDQVVYSLGERCQPGMGYPMY
RA14c .....GTR-----V-----
RAK 5 .....-GP----ARARA EFGT-----

51
RA14b SLPRCRAVVKRQCVATAH PAARGNEQLRQDCCRQLAAVDDSWCRC SALNH
RA14c -----GHGA-GGAVD-----
RAK 5 -----

101
RA14b MVGGIYRELGATDVGH PMAEVFPGCRRGDLERAAASLP AFCNVDI PNGTG
RA14c -----
RAK 5 -----

151
RA14b GVCYWLG Y.PRTPRTGH
RA14C -----T-----
RAK 5 -----

```

(B)

Figure 7. Comparison of nucleotide(A) and amino acid(B) sequence between RA14b-c and RAK5. (: Start codon, **: Stop codon)

Table 5. Percentage of nucleotide and amino acid sequence homologies between RA5b and RAK1-4.

	RA5b	RAK1	RAK2	RAK3	RAK4
RA5b	100%(100%)	98.72%* (99.02%)	100% (96.29%)	99.71% (98.29%)	99.31% (96.87%)
RAK1	---	100% (100%)	100% (99.02%)	99.68% (98.05%)	99.31% (96.87%)
RAK2	---	---	100% (100%)	99.71% (96.58%)	99.31% (96.87%)
RAK3	---	---	---	100% (100%)	99.31% (97.91%)
RAK4	---	---	---	---	100% (100%)

* Parathesis showed amino acid sequence homology.

Table 6. Percentage of nucleotide and amino acid sequence homologies between RA14b and RAK5.

	RA14b	RA14c	RAK5
RA14b	100%(100%)*	96.28%(91.25%)	92.98%(78.26%)
RA14c	---	100%(100%)	95.57%(92.46%)
RAK5	---	---	100%(100%)

* Parathesis showed amino acid sequence homology.

다. Mouse scFv antibody library의 제작 및 검색

정제된 16kDa protein 1mg을 Freund's complete adjuvant (Sigma Co., St. Louise, Mo)와 혼합하여 쥐(Fisher strain, Female)의 복강에 주사하여 spleen을 분리하고 total RNA를 분리하였고, 1st strand cDNA을 합성하였다. 이를 PCR을 이용하여 340bp heavy chain과 325bp light chain을 획득하였고, linker로 연결하여 765bp의 full length scFv antibody gene을 획득하였다. 이를 recombinant phage antibody system (Pharmacia)을 이용하여 1×10^4 크기의 mouse scFv antibody library을 제작하였다(그림 8).

라. 항원 특이적 recombinant phage의 검색

제작된 mouse scFv antibody library을 사용하여 5회에 걸쳐 rice allergen에 특이적으로 반응하는 scFv phage antibody를 검색하여 1차 검색에 대하여 증가된 특이성을 나타내는 scFv phage antibody clones을 확보하였다(Table 7).

마. ELISA를 통한 항원 특이적 positive phage의 검색

5차검색시 항원으로부터 elution한 phage를 준비하여 ELISA를 실시하였고 7개의 positive phage를 검색하였다.

Mouse scFv phage antibody library

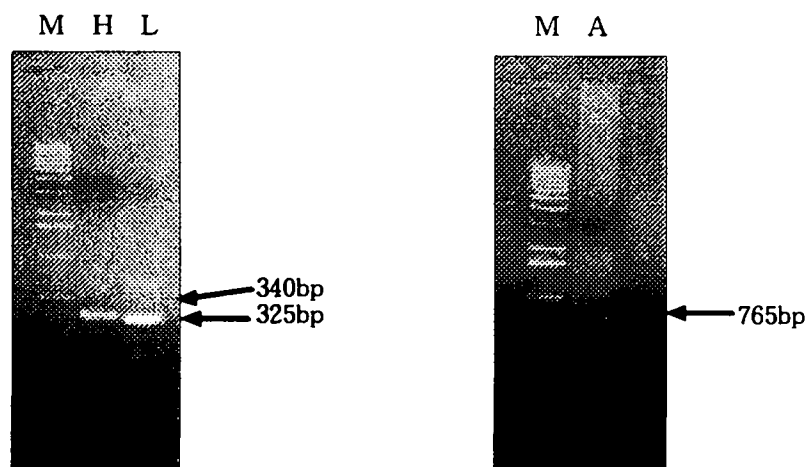


Figure 8. Mouse heavy chain and light chain PCR from immunized mouse mRNA and assembly PCR.

Table 7. Screening of scFv phage antibody library.

	input	output	output/input
1 ° screening	3.0×10^{10}	5.1×10^9	1.7×10^{-9}
2 ° screening	2.0×10^{11}	5.8×10^9	2.9×10^{-9}
3 ° screening	2.7×10^{11}	6.0×10^7	2.2×10^{-4}
4 ° screening	8.0×10^{12}	6.3×10^8	7.9×10^{-5}
5 ° screening	3.0×10^{11}	6.0×10^7	2.0×10^{-4}

제 4 절 고 찰

본 연구에서는 저 알레르기 쌀 종자의 획득을 위해서 1995년 일품벼의 수정란에 돌연변이 유기체인 N-methylnitrosourea(MNU)를 시간대별로 처리, 파종하여 유발한 약 10,000계통의 돌연변이체를 연구 재료로하여 이들로 부터 한 이삭당 무작위적으로 5알씩 ELISA를 이용하여 16kDa 쌀 알러젠의 분포를 조사하였다. ELISA에 사용된 1차 항체는 16kDa globulin 단백질을 rat에 투여함으로써 제작된 polyclonal 항체를 사용하였으며, 이 polyclonal 항체의 면역반응성을 western blot으로 확인하였다 (그림 1). 한편 그림 1에서 보여지는 것과 같이 rat에서 생산된 polyclonal 항체는 16kDa 쌀 알러젠단백질과 특이적으로 반응하였으며, 정상적인 rat의 혈청은 western blot 상 쌀 단백질과 반응을 보이지 않았다. 그러나 polyclonal 항체는 16kDa 쌀 알러젠 단백질외에 >100kDa 크기의 다른 단백질과도 반응을 보임으로서 본 연구에서는 immunoaffinity 방법을 사용하여 polyclonal 항체로부터 16kDa 단백질과 특이적으로 반응하는 항체를 다시 분리하여 저 알레르기 쌀 종자의 탐색을 위한 ELISA에 사용하였다. 그러나 이렇게 immunoaffinity 방법으로 분리된 16kDa 단백질 특이적 polyclonal 항체 역시 약하게나마 >100kDa 크기의 다른 쌀 globulin 단백질과 반응하는 것으로 보아 현재 알려진 16kDa 쌀알러젠 외에 이 알러젠과 면역학적으로 교차반응을 하는 또 다른 쌀단백질들이 존재하는 것으로 사료되며 이를 증명하기위한 쌀단백질 유전자에 관한 연구가 준비중에 있다.

ELISA를 통하여 대략 2,400이삭(12,000 seeds)을 조사한 결과 Table 1에 보여진 것 처럼 LAP(Low-Allergen protein)을 갖고 있다고 생각되는 것이 종자가 1차 검색과정에서 총 108개로 나타났다. 이 108개 종자를 다시 2차 검색하여 최종적으로 CM4에서는 7개, CM5에서는 19개, CM1에는 1개가 얻어졌다. 한편 1차 검색과정을 통해 선별된 108개의 돌연변이 쌀 종자의 일부를 그림 2에서와 같이 12% SDS-PAGE를 이용하여 단백질 함유 분포를 조사한 결과 16 kDa 쌀 알러젠 단백질만이 특이적으로 제거된 돌연변이 쌀종자를 확인하지 못하였으나 전체적으로 단백질 함량이 감소된 종자를 일부 확인할 수 있었다 (그림 2. lane 8). 한

편 2차 검색을 통하여 얻어진 결과를 토대로 쌀알레르겐의 함량이 저하된 종자가 발견된 이식들을 선별하였고, 그 이식들의 모든 종자들을 1/2씩 절단하여 반알을 ELISA 방법을 통한 3차 검색에 사용하였고 최종적으로 선별된 45개의 종자들을 12% SDS-PAGE, western blot을 통하여 쌀눈이 있는 반알들을 moist filter paper에 뿌려 파종을 위한 작업을 수행하였다. 1차년도에서 검색된 45개의 저알레르기 기능성 쌀종자를 가을에(2차년도) 추수하여 1차년도와 동일한 방법으로 검색을 실시하였다. 45개의 이식에서 무작위적으로 5개의 종자를 선택하여 단백질 함량을 검색한 결과 1차 검색에서는 20개의 종자가 선별되었고 2차 검색에서는 15개의 종자가 선별되었다(Table 3). 또한 polyclonal 항체와의 면역 특이성을 분석하기 위해서 western blot 방법을 이용하였다. 1차 검색에서는 21개의 종자가 선별되었고 2차 검색에서는 15개의 종자가 선별되었다(Table 3). 최종적으로 단백질 함량의 분포와 면역반응 결과를 기초로 하여 분석한 결과 16kDa allergenic 단백질이 저하된 종자에서는 항체와의 특이성 반응도 역시 낮게 나타났다는 것을 알수 있었다. 이렇게 검색된 15개의 종자는 역시 3차년도 가을에 수확을 위해서 파종을 하였고 14개의 종자만이 수확할 수 있었다. 14개의 단백질 함량을 조사하기 위해서 지금 연구중에 있다.

33개의 한국산 품종에서도 결과에서 보여지고 있는 것처럼 3개의 품종이 낮은 함량의 알레르겐을 함유한다는 것을 알수 있었다(Table 4, 그림 4). 이렇게 확보된 저알레르기성 종자들은 현재 한국, 일본을 비롯한 서구 선진국가등에서 사회적, 경제적으로 심각한 문제가 되고 있는 식품알레르기 연구에 귀중한 정보가 되리라 생각되며, type I 과민반응을 일으키는 특정 성인 뿐만 아니라 유아에게 있어서도 기능성 식품으로서 충분한 가치가 있을 것으로 기대된다. 한국산 품종에서 mRNA를 분리하여 rice-cDNA library를 제작하였다(4.5×10^5). 제작된 cDNA library는 plaque assay을 통하여 9개의 clones 선별할수 있었고 9개의 clones은 1.2% agarose electrophoresis를 이용하여 inserts의 크기를 확인한 결과 500-800bp의 다양한 다른 길이의 유전자 크기를 나타내었다. 9개의 allergen cDNA를 *E. coli*에서 1mM IPTG를 이용하여 induction 한 결과 유전자 재조합 단백질을 생산하였으며 전기영동에 의해서 단백질이 분리되었다. 그리고 이 유전자 재조합 단백질들은 western blot상에서 anti-16kDa rat

polyclonal 항체와 특이적인 반응을 보였고 정상적인 rat 혈청에서는 아무런 반응을 보이지 않았다. 9개의 모든 clones이 cDNA insert과 plaque assay에서 positive signal을 보였다 하더라도 5개의 clones만이 13-19kDa크기에서 anti-16kDa rat polyclonal 항체와 강한 면역 반응을 보여주었다(그림 5).

5개의 rice allergenic cDNA(RAK1-5)가 획득되었고, rice cDNA DNA sequence가 분석되었다(그림 6, 7). 그 결과 RAK1-4가 RA5b와 nucleotide와 amino acid level에서의 homology가 각각 99%, 96-99%로 밝혀졌고, RAK5와 RA14b, RA14c의 homology 분석 결과 RAK5와 RA14b의 nucleotide homology가 92.98%인 반면에 amino acid homology는 78.26%였다. RA14c와의 비교에서는 nucleotide는 95.57%였고 amino acid의 homology는 92.46%였다(Table 5, 6). Homology분석을 통하여 얻을수 있었던 새로운 사실은 rice allergen gene들이 시간과 환경의 변화속에서 evolution을 일으킨다는 것을 알수 있었고 쌀 알레르기는 하나의 유전자에 의해서 일어나는 것이 아니라 다양한 multigene family에 의해서 일어나는 것으로 사료된다.

본 연구에서 우리가 획득한 5개(RAK 1-5)의 rice allergenic cDNA clones은 한국산 쌀 종자로부터 유전 자원의 준비와 저 알레르기성 성분을 갖는 transgenic rice plants을 생산하기 위한 antisense gene으로서 rice의 유전적 변이에 응용될 것이라고 사료되며 식품 알레르기를 포함하는 type I 과민반응과 연관되는 모든 알레르기 연구 분야에 있어서 귀중한 초석이 되리라 기대되며, rice allergenic protein을 주입하여 immunized mouse의 spleen으로부터 mRNA를 분리하여 항체 유전자를 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 항체 유전자의 variable region 유전자를 분리 복제하였고 이를 클로닝하여, 재조합된 단일 클론 항체(recombinant single chain Fv, ScFv)를 만들었다. 이를 rice allergenic protein에 특이적으로 결합하는 항체 clone만을 panning을 통하여 검색하였으며, 그 과정을 통해 항원 특이적 결합력이 증가된 항체 clone을 획득할 수 있었다. 현재 이들 항체 clone들의 soluble antibody의 생산을 시도하고 있다.

본 연구에서 이용되어지는 phage display system을 이용하면 짧은 시간에 단일 클론 항체를 제조할 수 있는 잇점이 있을 뿐 아니라, 여러 가지 분자생물학적 기술을 이용하여 인공

적으로 항체의 항원 결합력을 높일 수도 있다(affinity maturation). 또한 이 방법은 인간의 혈액으로부터 항체 유전자를 분리하여 원하는 항원 특이성을 갖는 재조합된 인간 단일 클론 항체의 개발을 가능케 할 것이다. 또한 기존의 hybridoma cell에서 생산되어지는 단일 클론 항체가 IgM isotype이기 때문에 발생하는 문제점, 즉 낮은 친화력과 큰 분자량으로 인한 문제점들을 유전공학 기술을 이용하여 보다 친화력이 높은 단일 클론 항체를 개발하고 대량생산할 수 있도록 유도할 것이다. 이 항체는 진단에도 이용될 수 있고 또한 생쥐의 항체 유전자를 인간 항체의 유전자로 치환시켜 재조합된 인간 항체(humanized antibody)의 개발이 가능할 것이며, 궁극적으로 치료와 진단에 항체를 이용할 수 있게 할 것이다. 또한 인간 단일 클론 항체 제조에 따른 윤리적, 기술적 어려운 점을 극복할 수 있는 효과를 기대할 수 있을 것이다.

제 5 절 참 고 문 헌

1. Adachi, T., Izumi, H., Yamada, T., Tanaka, K., Tadeuchi, S., Nakanuma, R., and Matsuda, T. (1993) Gene structure and expression of rice seed allergenic proteins belonging to the α -amylase/trypsin inhibitor gene family. *Plant Mol. Biol.* 21:239-248.
2. Alvarez, AM., Adachi, T., Nakase, M., Aoki, N., Nakanuma, R., and Matsuda, T. (1995) Classification of rice allergenic protein cDNAs belonging to the α -amylase/trypsin inhibitor gene family. *Biochimica Biophysica Acta* 1251, 201-204.
3. Amano, M., Ogawa, H., Kouima, K., Kamidaira, T., Suetsugu, S., Yoshihama, M., Satoh, T., Samejima, T., Matsumoto, I. (1998) Identification of the major allergens in wheat flour responsible for baker's asthma. *J. Biochem.* 330(pt3): 1229-1234.
4. Andre, F., Andre, C., Colin, L., Cacaraci, F., and Cavagna, S. (1994) Role of new allergens and of allergen consumption in the increased incidence of food sensitizations in France. *Toxicol.* 93: 77-83.
5. Arumuganathan, K., and Earle, E. D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol.* 9: 208-218.
6. Barder, D., Sanchez, M. R., Gomez, L., Carpizo, J., Armentia, A., Lopez, O. C., Juan, F., and Salcedo, G. (1989) A barley flour inhibitor of insect α -amylase is a major allergen associated with baker's asthma disease. *FEBS Lett.* 248: 119-122.
7. Cagampang, G. B., Cruz, G. J., Esporitu, S. G., Santiago, R. G., and Juliano, B. O. (1996) Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chem.* 43: 145-155.
8. Gomez, L. (1990) Member of the α -amylase inhibitor family from wheat endosperm

- are major allergens associated with baker's asthma. FEBS Lett. 261: 85-88.
9. Ikezawa, Z., Miyakawa, K., Komatsu, H., Suga, C., Miyakawa, J., Sugiyama, A., and Sasaki, T., Nakajima, H., Hirai, Y., Suzuki, Y. (1992a) A probable involvement of rice allergy in severe type of atopic dermatitis in Japan. Acta Derm Venereol Suppl(Stockh) 176: 103-107.
 10. Ikezawa, Z., Ikebe, T., Ogura, H., Odajima, H., Kurosaka, F., Komatsu, H., Sase, K., Suga, C., Sugiuchi, M., and Suguro, H. (1992b) A probable involvement of rice allergy in severe type of atopic dermatitis in Japan. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 176: 103-107.
 11. Izumi, H., Adachi, T., Fujii, N., Matsuda, T., Nakanuma, R., Tanaka, K., Urisu, A., and Kurosawa, Y. (1982) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a major allergenic protein in rice seeds-Homology of the deduced amino acid sequence with members of α -amylase/trypsin inhibitor family. FEBS Lett. 302, 213-216.
 12. Ji, C., Body, C., Slaymaker, D., Okinaka, Y., Takeuchi, Y., Midland, S. L., Sims, J. J., Herman, E., and Keen, N. (1997) Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. Plant Biol. Vol. 95, pp. 3306-3311.
 13. Juliano, B. O. (1993) Rice in Humane Nutrition. FAO Feed and Nutrition series: No26. IRRI, Rome.
 14. Luh, B. S. (1991) Rice : Production. (2nd Edition) University of California, Davis. Van Nostrand Reinhold, NY.
 15. Matsuda, T., Sugiyama, M., Nakanuma, R., and Torii, S. (1988) Purification and properties of an allergenic protein in rice grain. Agric. Biol. Chem. 52, 1465-1470.
 16. Matsuda, T., Nomura, R., Sugiyama, M., and Nakanuma, R. (1991) Immunochemical studies on rice allergenic proteins. Agric. Biol. Chem. 55, 509-513.
 17. Momma, M., Haraguchi, K., Saito, M., Chikuni, K., Harada, K. (1997) Purification

- and characterization of the acid soluble 26-kDa polypeptide from soybean seeds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61(8): 1286-1291.
18. 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.
19. Ogawa, M., Kumamaru, T., Satoh, H., Iwata, N., Omura, T., Kasai, Z., and Tanaka, K. (1987) Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. *Plant Cell Physiol.* 28(8): 1517-1527.
20. Padhye, V. W., and Salunkhe, D. K. (1979) Extraction and characterization of rice proteins. *Cereal Chem.* 56(5): 389-393.
21. Sanchez, M. R., Garcia, C. G., Lopez, O. C., Armentia, A., Salcedo, G. (1997) Wheat flour peroxidase is a prominent allergen associated with baker's asthma. *Clin Exp Allergy.* 27(10): 1130-1137.
22. Shibasaki, M., Suzuki, S., Nemoto, H., and Kuroume, T. (1979) Allergenicity and lymphocyte-stimulating property of rice protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* 64: 259-265.
23. Urisu, A., Yamada, K., Matsuda, S., Komada, H., Wada, E., Kondo, Y., Horiba, F., and Tsuruta, M., Yasaki, T., Yamada, M. (1991) 16-kDa rice protein is one of the major allergens in rice grain extract and responsible for cross-allergenicity between cereal grains in the Poaceae family. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 96: 244-252.
24. Watanabe, M., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Suzuki, Y., Hirano, T., Yoshizawa, T., and Arai, S. (1990) Production of hypoallergenic rice by enzymatic decomposition of constituent protein. *J. Food Sci.* 55: 781-783.
25. Yamada, K., Kishimoto, M., Inagaki, Y., Inamoto, M., Komada, H., Yamada, M., and Torii, S. (1985) *Shonika Rinsho* 38: 2545-2560.

제 7 장 총 론

Phytate 섭취(현미수준의 1/2)는 체내의 미네랄대사에 영향을 주고 있음이 3년간의 연구 결과로 부터 확실하게 밝혀졌다. 특히, 2년차에서 phytate 섭취는 나이에 따라 그 생리적 효과는 age-dependent 임을 알 수 있었다. 중요한 것은 쌀은 일생동안 섭취하기 때문에 적은 량이라 하여도 생체에서 미치는 축적된 효과는 무시할 수 없을 것이다. 본 3년차 연구에서는 4개월 동안 실험동물에 phytate를 투여하였을 때, 혈청콜레스테롤농도는 단기간 투여시와는 달리 증가하는 현상을 나타내었다. 이러한 측면에서 phytic acid 섭취시의 이점 보다 불리한 효과가 더 크다는 것을 확인할 수 있었다.

In vitro로 몇가지의 phytic acid의 좋은 효과가 알려지고 있지만 근본적으로 인간에게 있어 phytic acid는 흡수되지 않기 때문에, 세포내에서 일어나는 효과는 기대하기 어려운 것이 사실이다. 이러한 경우 phytic acid의 물리적효과를 강조하여 phytic acid에 의한 Ca 흡수정도를 감소시키는 것이 기능성식량을 만드는데 이상적일 것이다. 현재 본 연구기간 제작된 쌀을 투여시, 하루 Ca으로 약 100mg의 부가적인 섭취효과가 있으며, 이는 현재 국민의 Ca 섭취량은 요구량의 75% 정도에 이르는 실정이나, 이러한 요구량의 90%까지 충족시킬 수 있는 영양적가치를 갖는다. 이러한 측면에서 phytic acid 함량을 낮춘 쌀의 개발은 국민 건강향상에 중요한 역할을 할 것으로 믿어 의심치 않는다.

일반적으로 스크리닝에 있어 검사체의 수는 일반 분석 방법으로는 감당 할 수 없을 만큼 방대한 수이기 때문에 신속한 스크리닝 방법의 확보는 목적으로 하는 식물체 선발에 있어 매우 중요하다. 본 연구에서는 저 피틴산 돌연변이체(LPR) 스크리닝을 위한 미량분석법을 개발하였으며 단시간에 50,000여 개의 시료를 처리하여 LPR의 스크리닝을 가능하게 하였다. 10,000여 계통의 M₂ seed를 한 계통당 5종실을 처리하여 피틴산이 90% 이상 감소한 5계통과 70% 이상 감소한 5계통, 50% 이상 감소한 16계통을 스크리닝 하였으며 이듬해 봄 모내기 적기에 90% 이상 감소한 5계통을 파종하였다. M₃ seed는 35계통을 수확하였으며 10개의 종실을 무작위로 선택하여 반으로 절단한 후 배아쪽의 반알은 보관하고 반쪽만으로 스크리닝한

결과 즉, 반으로 절단한 350개의 종실을 분석한 결과 피틴산이 90%이상 감소한 종실이 250여 개로 약 70%의 종실에서 90% 이상 감소한 것으로 HPLC, HVPE 또는 비색법 등 각종 방법을 통하여 확인한 결과 밝혀졌다.

또한 LPR 의 기본적인 식품학적으로 전분의 성질, 지방산의 조성, 단백질의 조성 등은 LPR 이나 parent에 있어서 큰 변화는 발견할 수 없었다. 그러나 단백질에 있어서 acid soluble fraction의 경우 LPR 에서 parent 보다 훨씬 많은 종류의 단백질이 추출되고 있다. 즉, 종실 내 피틴산의 존재 유무는 단백질의 추출 또는 용출에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 피틴산과 단백질이 복합체를 형성함으로써 소화관내에서 소화효소와 복합체를 형성하여 소화 효소의 활성을 저해하기도 하며, 또한 이들 복합체는 소화효소가 작용하기 어려워 피틴산은 단백질의 소화 흡수에 큰 영향을 미치게 된다. 따라서 피틴산의 농도를 낮춤으로써 쌀 속에 존재하는 단백질의 이용효율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

저 phytate 함량계통의 벼 선발을 위하여 일품 및 영덕품종에 돌연변이원으로 MNU를 처리하였으며, 저 phytate산의 돌연변이가 많이 선발된 처리시간대는 수분 후 12·13·18·20·21시간이 경과한 것이었다. 처리에 따른 온도는 처리장소의 온도와 처리액의 온도로 구분되며 전자가 25~29℃의 범위, 후자는 26~27℃의 범위가 적당한 것으로, MNU의 처리농도는 1mM이 효율적이었다. 벼수정란에 MNU 처리시간은 45~50분, 처리액의 pH는 4.8의 경우가 가장 효율적인 결과를 보였다. 저 phytate산을 함유하는 돌연변이체는 영덕벼에서 2계통, 일품벼에서 35계통이 확보되었다. 210개의 교배조합으로 부터는 적어도 2개의 대립유전자군이 존재함을 알 수 있었다. 전반적으로 저 phytate 함유 돌연변이체의 경우는 정상의 일품벼와 비교하여 생육조사의 결과가 큰 차이가 없이 출수기도 일정하고 재배 및 생육상태도 양호하였다.

피틴산 생합성 관련 유전자에 대한 마커를 개발하고 이들 유전자를 직접 분리하고자 RAPD, AFLP, DD-RT PCR, mRNA-AFLP 등의 분석을 저 피틴산 돌연변이들과 컨트롤간에 실시하였다. 또한 피틴산의 분해효소인 phytase를 벼에서 분리하고자 곰팡이 *Aspergillus*의 phytase 유전자의 보존지역의 염기서열을 기초로 한 primers를 가지고 벼에서의 phytase 유

전자를 분리하고자 하였다. RAPD와 AFLP의 분석을 통하여 약 6000 여 단편들을 저 피틴산 돌연변이들과 컨트롤간에 분석 비교하였으나 다형화 밴드를 획득하지 못하였는데 이는 아마도 이들 돌연변이의 변이가 점 돌연변이에 기인한 것으로 사료된다. 그러므로 컨트롤과 돌연변이들의 유전자 발현의 차이에 의해 유전자 클로닝을 하고자 DD-RT PCR과 mRNA-AFLP 등을 실시하였다. DD-RT PCR을 이용하여 분리한 단편들에는 콩의 cellulase 유전자와 아주 높은 상동성을 가진 단편 ($T_{11}CA-250bp$), 유전자 은행에 등록된 벼의 미성숙 배 발현 유전자들인 ISAJ1053 와 R1037-2B 등과 같은 염기를 가진 $T_{11}CA-320 bp$, $T_{11}CA-300bp$ 단편 등을 획득하였으며 이들은 Southern 분석 결과 벼의 게놈에 단일 copy로 존재함이 확인되었다. 또한 mRNA-AFLP 분석에서도 돌연변이 또는 컨트롤에 특이하게 발현되는 단편을 17개 획득하였다. 곰팡이의 phytase 프라이머로부터 증폭하여 얻은 단편의 크기는 1069 bp 이었는데 이 단편은 sense 단편은 벼의 NADH-dependent reductase와 90%의 상동성을 가지며 antisense 단편은 ADP-glucose phosphorylase subunit SH2 와 85%의 상동성을 갖는 DNA 단편으로 밝혀졌다.

한국, 일본을 포함한 아시아권의 나라에서의 주식인 쌀과 연관된 알레르기가 급격히 증가하고 있는 추세이며, 쌀 섭취시 알레르기 반응을 보이는 환자의 혈청중 IgE 항체와 쌀 단백질과의 반응을 immunoblot을 통해서 알아본 결과 14-16kDa globulin protein이 주요 쌀 알러젠으로 밝혀졌다.

본 연구에서는, 저 알레르기 쌀 종자의 개발을 위해서 약 10,000계통의 일품벼 돌연변이체를 연구재료로 하여 ELISA와 SDS-PAGE로 검색한 결과 1 차년에는 45개 종자를 확보하였다. 이 종자들은 moist filter paper에 뿌려 파종하여 2 차년에 수확하였고 동일한 방법으로 저 알레르기 쌀 종자를 검색한 결과 15개의 종자에서 항체와의 반응 특이성이 낮게 나타났다는 것을 확인하였다. 15개의 종자를 역시 3차년도에 파종을 하여, 14개의 종자를 수확하였다. 또한 33개의 벼품종에서도 ELISA방법을 토대로 하여 유의성을 검증한 결과 낙동, 안산, 화천찰벼 3종만이 16kDa의 단백질이 낮게 분포한다는 것을 확인하였고, 이렇게 확보된 저 알레르기성 종자들은 type I 과민반응을 일으키는 특정 성인 뿐만아니라 유아에게 있어서도

기능성 식품으로서 충분한 가치가 있을 것으로 기대한다.

한편 쌀 알러젠의 유전자특성 분석을 위하여 λ UniZap vector를 이용하여 rice cDNA library를 만들었으며 library를 rat anti-16kDa globulin protein polyclonal 항체를 이용하여 검색하였고, RAK 1-5로 명명된 5개의 cDNA clones이 획득되었다. 이 clone들은 13-19kDa의 유전자 재조합 단백질을 coding하고 있으며, DNA sequencing 분석결과, RAK 1-4는 RA5b와 99%의 sequence homology를 보여주었고 RAK5는 RA14c와 96%의 homology를 보여주었다. 획득된 쌀 알러지 유전자는 한국 쌀 품종의 유용유전자 확보 및 유전자 이식기술등을 통한 저알러지 쌀 종자의 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.