

韓國 在來 및 野生種 콩의 Leucine Aminopeptidase 變異

朴京淑* · 尹文燮**

Variation of Leucine Aminopeptidase Isozyme in Korean Land Races and Wild Soybeans

Kyung Sook Park* and Mun Sup Yoon**

ABSTRACT : A total 943 accession of soybeans(*G. max*) and 50 wild soybeans(*G. soja*) were examined for leucine aminopeptidase(LAP) isozyme variation by 5% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) and isoelectric focusing(IEF) of pH 4~6.5. The *Lap1*b* by PAGE was the most common phenotype in both *G. max* and *G. soja*. The frequency of *Lap1*b* allele was observed to be higher in *G. max*(1.00) than in *G. soja*(0.96) of Korea. This result shows that *G. max* is fixed for *Lap1*b* allele at the *Lap1* locus.

LAP isozyme band type I and II were found using IEF of pH 4~6.5 in *G. max* and *G. soja* of Korea. Type I was observed from 92.8% in *G. max* and 92.0% in *G. soja*, and type II was discovered in 7.2% *G. max* and 8.0% *G. soja*. This result suggested the possibility to be found more various band types.

Key words : Soybean, Leucine aminopeptidase, Polyacrylamide gel electrophoresis, Isoelectric focusing, *Lap1-a*, *Lap1-b*.

最近 각종 作物에서 遺傳資源의 광범한 蒐集이 이루어지고 있으나, 蒐集系統의 評價와 維持를 하는데 막대한 經費가 所要되고 또 적당한 圃場의 확보는 물론 時間과 季節의 制限을 받아 많은 어려움을 겪고 있다. 특히 大豆의 경우는 蒐集場所가 다른 地域에서 栽培評價될 경우에는 環境變異에 銳敏하게 反應함으로 調查結果의 說明에 誤謬를 범하기 쉽다. 그러나 단백질 data는 環境의 影響을 적게 받으므로 大豆 遺傳資源의 變異評價에 편리하다^{2,12)}.

현재까지 大豆의 同位酵素分析 및 形態의 形質을 통하여는 단지 2~3개의 標識因子로 構成된 13개의 聯關群을 形成하였다. 이러한 結果들은 大

豆가 많은 數의 染色體(2n=40)를 갖고 있으며 染色體地圖 作成을 위해서 利用할 수 있는 形態의 形質이 制限되어 있고 또한 작고 自家受精 꽃이기 때문에 交配하기 어렵다는 缺點들 때문에 다른 作物에 비해 貧弱한 mapping group을 形成하였다⁴⁾.

Leucine aminopeptidase (LAP, EC 3. 4. 11. 1)는 nonspecific exopeptidase로서 peptide의 free α -amino group에 인접한 peptide結合을 加水分解하는 酵素이다. LAP는 수많은 polypeptide의 N-terminal로부터 amino acid를 連續적으로 遊離시킨다. 또한 이 酵素는 L-leucine β -naphthylamide HCl과 같은 基質과 급속히 反應

이 研究는 1995년도 誠信女子大學校 學術研究助成費의 支援으로 遂行되었음.

* 誠信女子大學校 生物學科 (Dept. of Biology, Sung Shin Women's Univ., Seoul 136-742, Korea)

** 慶熙大學校 農學科 (Dept. of Agronomy, Kyung Hee Univ., Suwon 449-701, Korea)

<'96. 9. 23 接受>

한다⁶⁾.

대두에는 *Lap1*과 *Lap2*의 두 개의 遺傳子座가 있다. *Lap1* 遺傳子座에는 *Lap1-a*(Rf 0.49)와 *Lap1-b*(Rf 0.53)의 두 개의 遺傳子가 있으며 發芽 10~12일 후에는 發現되지 않는 반면, *Lap2* 遺傳子座는 건조종자에서는 發現되지 않고 발아 8일 후부터 綠色組織에서 發現되며 *Lap2-a*(Rf 0.75), *Lap2-b*(Rf 0.80) 및 *lap2*(null)의 3개의 遺傳子가 있다. 그리고 *Lap1*과 *Lap2*의 이 두 유전자좌간에는 서로 關聯되어 있지 않다^{1,6,7)}.

*Lap1*은 單一 遺傳子座에 의해 調節되는 2개의 共優性 對立因子로 *Lap1-a*보다는 *Lap1-b*가 栽培種(*G. max*)과 野生種(*G. soja*)에서 가장 흔한 對立因子로 알려져 있으며, Kunitz trypsin inhibitor(*Ti*) 遺傳子座와는 15.3±0.9%의 再組換 頻度로 acid phosphatase(*AP*) 遺傳子座와는 19.9%±0.01%의 再組換 頻度로 關聯되어 있으며 제 9關聯群에 속한다. 또한 β -amylase(*Am-3*), diaphorase(*Dia3*) 그리고 phosphoglucosylase(*Pgml*)와는 獨立的으로 遺傳된다^{4,5)}.

*Lap2*는 大豆 植物體의 綠色組織에서 發現되며, 栽培種(*G. max*)과 野生種(*G. soja*)에서 모두 나타난다. *Lap2*의 3개 유전자인 *Lap2-a*, *Lap2-b* 그리고 *lap2*는 단일 遺傳子座에 의해 調節되며 *Am3* 그리고 flower color(*W1*) 遺傳子座와는 獨立的으로 遺傳된다³⁾.

본 研究는 生物多樣性 保存 維持 研究의 일환으로 *Glycine max* 와 *G. soja*의 multi-enzyme system 중 β -amylase¹¹⁾, soybean trypsin inhibitor¹⁰⁾, lectin⁹⁾, lipoxygenase⁸⁾에 이어 leucine aminopeptidase 同位酵素로 韓國의 在來種과 野生種 大豆 遺傳資源의 變異를 調査함을 目的으로 한다.

材料 및 方法

1. 供試材料

본 研究에 사용된 供試材料는 慶熙大學校 産業大學 農學科 大豆遺傳資源 保存室에 保管되어 있는 在來種 大豆(*Glycine max*) 943系統과 江原道

蒐集種인 野生種(*Glycine soja*) 50系統을 利用하였다.

2. 試料抽出

乾燥種子 1g을 10ml의 phosphate buffer에 24시간 담근 후 homogenization하여 4℃에서 5,000rpm으로 30분간 遠心分離하여 그 上等液을 試料로 利用하였다. 等電點電氣泳動(isoelectric focusing)에서는 乾燥種자를 마쇄한 다음 3次 蒸溜水와 4% PVP(polyvinyl pyrrolidone)를 넣어 12,000rpm에서 30분간 遠心分離한 후 그 上等液을 電氣泳動 試料로 利用하였다.

3. 電氣泳動法

5% polyacrylamide gel(Tris-HCl, pH 8.8)을 electrode buffer인 boric acid-NaOH(pH 8.0)를 利用하여 電氣泳動하였다. 電氣泳動후 gel은 40mg의 L-leucine β -naphthylamide(HCl)의 基質과 100mg의 MgCl₂ 補助因子를 넣은 0.05M Tris-malate buffer(pH 6.0) 100ml로 37℃에서 1시간 동안 恒溫處理하였다. 等電點電氣泳動(IEF)은 6% polyacrylamide gel에 pH 4~6.5의 3% phamalyte를 添加한 水平型 電氣泳動法으로 陰極에는 0.5M NaOH를 陽極에는 0.5M acetic acid를 使用하여 처음 100V에서 1시간 電氣泳動시킨 후 약 4시간 동안 200~600V에서 電氣泳動시켰다. 染色法은 PAGE와 同一한 方法으로 遂行하였다.

結果 및 考察

1. 大豆遺傳資源의 *Lap1* 變異

韓國 在來種 大豆 943系統과 野生種 50系統을 5% polyacrylamide gel 電氣泳動으로 leucine aminopeptidase 同位酵素를 分析하여 leucine aminopeptidase(*Lap1*) 表現型과 對立因子 頻度を 표 1에 나타냈다. 在來種(*Glycine max*)과 野生種(*G. soja*)에서 *Lap1***b*가 가장 흔한 對立因子였다. *Lap1***b*의 對立因子 頻度は 韓國 野生種(0.96)에서 보다 在來種(1.00)에서 더 높았다. 이

Table 1. *Lapl* phenotypes and allele frequencies of *G. max* and *G. soja* of Korea

	N	<i>Lapl-a/a</i>	<i>Lapl-a/b</i>	<i>Lapl-b/b</i>	Allele frequencies
<i>G. max</i>	943	0	0	943	<i>Lapl*a</i> =0.00 <i>Lapl*b</i> =1.00 <i>Lapl*a</i> =0.04
<i>G. soja</i>	50	2	0	48	<i>Lapl*b</i> =0.96

Table 2. Distribution of Korean *G. max* and *G. soja* classified with leucine aminopeptidase isozyme phenotypes by isoelectric focusing

	N	I type	II type
<i>G. max</i>	85	79(92.8%)	6(7.2%)
<i>G. soja</i>	50	46(92.0%)	4(8.0%)

러한 결과는 Kiang等⁵⁾이 *Lapl*b*의 對立因子 頻도가 野生種(0.879)보다 栽培種(0.985)에서 더 높았다는 것과 一致하였다.

본 실험에서 *G. max* 943系統은 모두 *Lapl-b/b*로 *Lapl*a*는 homozygote나 heterozygote로 나타나지 않아 *Lapl*b*의 頻도는 1.00으로 나타났다. 이는 Perry等¹²⁾이 Africa, Europe, China, Japan, South West and Central Asia 와 Korea 등이 origin인 대두(*G. max*)에 대한 *Lapl*의 對立因子를 調査한 결과, *Lapl*b*의 對立因子 頻도가 0.98~1.00으로 나타났으며, 또한 781系統의 韓國 栽培種 중에서는 忠淸道와 慶尙道에서만 *Lapl-b*의 對立因子 頻도가 0.99로 그 외에는 모두 變異型이 없는 것으로 나타나 본 실험에서 얻은 결과와도 一致하는 傾向을 나타냈다. Kiang 等⁵⁾에 의하면 栽培種중 *Lapl* 양쪽 모두의 對立因子를 지닌 Acme를 確認하였으나 血統(pedigree)인 Pagoda, Manitoba Brown, Mandarin Ottawa에서 *Lapl-a*의 表現型이 發見되지 않아 이는 최근의 突然變異, 꽃가루의 流入 혹은 混種의 結果였을 것으로 推定하였다.

韓國 野生種 50系統을 分析한 結果 *Lapl-b/b*가 96%, *Lapl-a/a*는 4%이고 heterozygote 인 *Lapl-a/b*는 나타나지 않아 *Lapl*a*의 遺傳子 頻도는 0.04로 野生種내에서 *Lapl*a*의 對立因子를 確認하였다. 이는 Kiang 等²⁾에 의해 韓國에서 蒐集된 7개의 野生콩 集團중 2集團(K_6 , K_7)에서

는 *Lapl*a*의 對立因子 頻도가 각각 0.50으로 높게 나타났고, 또한 日本에서 蒐集된 5集團중 2集團(K_{101} , M)에서는 *Lapl-a*의 對立因子 頻도가 1.00으로 나타남으로서 이는 野生種內 變異가 많은 *Amy3¹¹⁾*와 더불어 *Lapl*의 變異도 野生種內에서 더 높았음을 또한 確認하였다.

2. IEF에 의한 大豆 遺傳資源의 LAP isozyme 變異

PAGE에 의해 分析한 *Lapl* 遺傳子座는 *Lapl-a*와 *Lapl-b*의 두 對立因子만으로 區別되나 等電點電氣泳動으로는 pI(isoelectric pH)에 따라 分離되어 遺傳의 特性 파악에 PAGE보다 더욱 效果的이다. 따라서 等電點電氣泳動(IEF)을 利用하여 在來種과 野生種의 LAP 同位酵素의 band type을 調査하였다.

본 실험에서 遂行한 韓國 在來種 85系統과 野生種 50系統을 pH 4~6.5의 IEF로 實驗한 結果 그림 1에서와 같이 high pH쪽의 band type을 I ty-

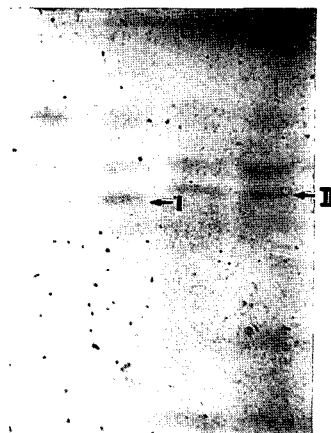


Fig. 1. Leucine aminopeptidase isozyme type in Korean *G. max* and *G. soja* by isoelectric focusing(pH 4~6.5).

pe으로 low pH쪽의 band type을 II type으로 區分할 수 있었다. 在來種에서 I type은 79系統(92.8%)이고 II type은 6系統(7.2%)이었다. 野生種에서 I type은 46系統(92.0%)이었고 II type은 4系統(8.0%)로 나타나 *Lap1* 遺傳子座가 더 細分化되는 傾向을 보임으로써 앞으로 더 많은 材料를 分析하게되면 더 다양한 band type이 나타날 수 있는 可能性을 보였다.

摘 要

韓國 在來種 大豆(*Glycine max*) 943系統과 江原道 地域 蒐集種인 野生種(*G. soja*) 50系統을 polyacrylamide gel electrophoresis와 isoelectric focusing 電氣泳動으로 LAP 同位酵素를 分析한 結果를 要約하면 다음과 같다. PAGE에 의해 *Lap1*b*는 在來種과 野生種에서 가장 흔한 對立因子였다. *Lap1*b*의 對立因子 頻度は 韓國 野生種(0.94)에서보다 在來種(1.00)에서 더 높았다. 이러한 結果는 韓國 在來種 大豆는 *Lap1* 遺傳子座에서 *Lap1*b* 對立因子로 固定되어 있음을 나타내는 것이다. IEF 電氣泳動法을 이용하여 pH 4~6.5의 gel에서 LAP 同位酵素의 band type을 確認한 結果 在來種과 野生種에서 I type과 II type의 band type을 確認하였다. 在來種과 野生種에서 II type이 6系統(7.2%)과 4系統(8.0%)으로 각각 나타났고 I type은 79系統(92.8%)과 46系統(92.0%)으로 각각 나타났다. 이러한 結果는 다양한 band type이 나타날 수 있는 可能性을 提示하고 있다.

引用文獻

1. Gorman M.B, Y.T Kiang, R.C Palmer and Y.C Chiang. 1983. Inheritance of soybean electrophoretic variants. *Soybean Genet. Newsl.* 10 : 67-84.
2. Kiang Y.T and Y.C Chiang. 1990. Comparing differentiation of wild soybean

(*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) population based on isozymes and quantitative traits. *Bot. Bull. Academia Sinica* 31 : 129-142.

3. _____ and _____. 1987. Genetic analysis of the *Lap1* locus in soybeans and tests of linkage with other loci. *J. Hered.* 78 : 131-132.
4. _____ and _____. 1986. Genetic linkage of a leucine aminopeptidase locus with the Kunitz trypsin inhibitor locus in soybeans. *J. Hered.* 77 : 128-129.
5. _____, _____ and M.B Gorman. 1985. Genetic and linkage analysis of a leucine aminopeptidase in wild and cultivated soybean. *Crop Sci.* 25 : 319-321.
6. _____, _____ and _____. 1984. Inheritance of a second leucine aminopeptidase locus and tests of its linkage with other loci. *Soybean Genet. Newsl.* 11 : 143-145.
7. _____ and M.B Gorman. 1983. Soybean. Pages 295-328. in S.D. Tanksley and T.J. Orton(eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding*, Parts B. Elsevier Science Publishers.
8. Kwon S.H, K.S Park, M.Y Kim, B.R Kim and H.S Song. 1993. Screening for genotypes lacking lipooxygenase from germplasm collection of Korean soybean land races. *Korean J. Crop Sci.* 37(6). : 528-533.
9. _____ and _____. 1991 Genotype variation of phytolectin in Korean land races and wild soybeans. *Korean J. Breed.* 23 : 48-52.
10. _____, M.R Chae, K.S Park and H.S Song. 1990. Trypsin inhibitor variants in Korean land races and wild soybeans. *Korean J. Crop Sci.* 35(2) : 171-175.
11. Park K.S. and S.H Kwon. 1993. Variation of beta-amylase in Korean land races and

- wild soybeans, Korean J. Breed. 25(2) : 151-155.
12. Perry M.C, M.S McIntosh and A.K Stoner. 1991. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: II. allozyme frequencies. Crop Sci. 31 : 1356-1360.