

SELDI-TOF MS를 활용한 혈당강하 수수 종자의 펩타이드 프로파일링 및 특이 발현 펩타이드 선별

박세준* · 황수민** · 박준영* · 고지연*** · 김태완***†

*국립한경대학교 식물생태화학연구소, **국립한경대학교 식물생명환경과학과,
***농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부

Peptide Profiling and Selection of Specific-Expressed Peptides in Hypoglycemic Sorghum Seed using SELDI-TOF MS

Sei Joon Park*, Su Min Hwang**, Jun Young Park*, Jee-Yeon Ko***, and Tae Wan Kim***†

**Institute of Ecological Phytochemistry, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea.*

***Department of Plant Life and Environmental Science, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea.*

****Department of Functional Crop, NICS, RDA, Milyang, 627-803, Korea*

ABSTRACT Sorghum seed is traditionally used as secondary food sources in addition to rice in Korea. While the hypoglycemia regulating phytochemicals have been found in sorghum seed, peptides related with hypoglycemia never been studied before. To obtain the peptide characteristics and the specifically high-expressed peptides in hypoglycemic sorghum seed, peptide profiles of seven hypoglycemic and five non-hypoglycemic sorghum lines bred in RDA were determined using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS). The twelve sorghum lines exhibited 104 peptides on CM10 protein chip array (weak cation exchange) and 95 peptides on Q10 (weak cation exchange) in the molecular mass range from 2,000 to 20,000 Da. Heat map via supervised hierarchical clustering of the significantly different peptides ($p < 0.01$) in peak intensity among the 12 lines effectively revealed the specifically up-regulated peptides in each line and distinguished between 7 hypoglycemic and 5 non-hypoglycemic lines. Through the comparison with hypoglycemic and non-hypoglycemic lines, 10 peptides including 2231.6, 2845.4, 2907.9, 3063.5, 3132.6, 3520.8, 4078.8, 5066.2, 5296.5, 5375.5 Da were specifically high-expressed in hypoglycemic lines at $p < 0.00001$. This study characterized seed peptides of 12 sorghums and found ten peptides highly expressed for hypoglycemic sorghum lines, which could be used as peptide biomarkers for identification of hypoglycemic sorghum.

Keywords : sorghum, seed, peptide, hypoglycemic, SELDI-TOF MS

수수 종자는 아프리카, 아시아를 포함한 반건조 열대 지역에서 에너지원과 단백질원을 공급하는 주요 식량자원으로 이용되고 있으며(Belton & Taylor, 2004), 우리나라에서는 전통적으로 혼반용 또는 떡 등의 식량보조 식품으로 이용되고 있다. 또한 최근에 수수의 건강 보조 및 증진 효과에 대한 연구가 활발하게 진행되면서, 성인병의 대표적인 만성질환인 당뇨, 및 노화에 대한 억제 효과가 우수하다는 결과가 보고되고 있다(Jeon *et al.*, 2011; *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2011). 수수 종자에 함유된 주요한 건강 증진 물질로는 페놀 화합물 등의 식물체 이차 대사물질이 확인되고 있다(Dykes & Rooney, 2006).

혈당강하 관련 최근 국내 연구에서, 혈당강하 및 항산화 효과가 우수한 수수 ‘밀양 3호’가 개발되었으며, 수수 추출물 유래 fatty acid amides가 탄수화물 가수분해효소(α -amylase와 α -glucosidase)에 대한 억제 효능이 우수하다고 보고되었다(RDA, 2013). 또한 수수 추출물은 당뇨 동물모델에서 혈당 및 콜레스테롤 강하 효과가 있었으며, 이는 pAMPK/AMPK ratio 증가, PEPCK와 phosphor-p38/p38 ratio 감소, PPAR- γ 의 발현을 통해 인슐린민감성을 개선 기전을 보고하였다(Park *et al.*, 2012).

†Corresponding author: (Phone) +82-31-670-5081 (E-mail) taewkim@hknu.ac.kr

<Received 16 January, 2014; Revised 17 February, 2014; Accepted 26 February, 2014>

식물 유래 항당뇨와 관련하여 amaranth의 종자 단백질 glutelin (Silva-Sanchez *et al.*, 2008)과 콩 종실에 leginsulin (cysteine-rich peptides)가 혈당조절 기작에 관여한다고 최근에 보고 되었지만(Kim *et al.*, 2012), 수수 종자 단백질에 대한 연구 보고는 없다. 수수종자 단백질의 인체 건강 증진 효과에 대한 연구 결과로는 프롤라민 단백질의 키모트립신 분해 수화물이 혈압 저하 효과(Kamath *et al.*, 2007)와 수수 종자에서 추출한 펩타이드 및 단백질이 항균 및 항바이러스 효과를 보고되었다(Camargo Filho *et al.*, 2008; Mincoff *et al.*, 2006). 작물 종자에서 유래된 펩타이드가 의학, 제약 및 식품학계에서 건강 기능성 요인(기능성 펩타이드, bioactive peptides)으로 밝혀지고 있으며(Farrokh *et al.*, 2008; Hartmann & Meisel, 2007), 기능성 펩타이드를 유발하는 식물 공급원은 밀, 콩, 옥수수, 벼, 버섯, 호박 및 수수 등으로 매우 다양한 작물의 종자에서 유래되고 있음이 보고되고 있어(Ng, 2004; Sarmadi & Ismail, 2010), 수수종자 단백질 및 펩타이드의 인체 건강 증진에 기능성 역할을 시사하고 있다.

SELDI-TOF MS (surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)은 단백질 칩을 이용하여 펩타이드를 검출하고 정량화하는 질량분석기술이다. 단백질 칩 표면의 크로마토그래픽의 화학적 물질분리 기능을 부여함으로써, 특별한 물질 분리과정 없이 추출된 조시료(crude sample)의 화학적 특성에 따라 칩 표면에서 직접 분리하고 바로 질량분석을 하기 때문에 단시간에 대량의 시료를 분석하는 high-throughput 프로테오믹스 방법으로 적용되고 있다. 하지만 질량분석의 범위가 30 kDa 이하의 저분자 단백질에 제한이 되며, 검출된 펩타이드를 동정하지 못하는 단점이 있지만, top-down 방식의 펩타이드 프로파일링과 펩타이드 양적 발현 비교가 가능하다(Issaq *et al.*, 2002; Ndao *et al.*, 2010). SELDI-TOF MS 기술의 적용은 각종 암을 포함한 다양한 질병의 조기 진단을 위한 혈청 및 혈장 단백질의 펩타이드 프로파일링 및 바이오 마커 개발(Ndao *et al.*, 2010; Petricoin & Liotta, 2004)로 시작되었다. 식물 연구에서 Phytic acid 함량이 낮은 쌀 계통에서 Phytic acid 연관 펩타이드 마커(8,642 Da) (Emami *et al.*, 2010)와 포도 품종 식별을 위한 바이오마커가 SELDI-TOF MS 기법을 적용하여 보고 되었다(Povero *et al.*, 2010). 국내 연구로서는 SELDI-TOF MS를 이용한 벼 종자 단백질의 펩타이드 분석으로 근연 관계가 가까운 일품벼, 고아미2호, 고아미 3호의 판별이 가능 하였으며, 각 품종별 바이오마커를 선별하였으며(Park *et al.*, 2013), 수수종자의 펩타이드 프로파일링을 위한 SELDI-TOF MS 분석조건 최적화 연구가 선행되었다(Park *et al.*, 2013).

현재까지 식물 및 종자 펩타이드의 프로파일링에 관한 연

구는 매우 미진하다. 펩타이드 프로파일링은 단백질 프로파일링의 연구 방법적 역할과 같이 분자량이 10 kDa 이하의 저분자 단백질 즉, 펩타이드의 양적 또는 질적 형질을 특성화 할 수 있으며, 외적 내적 환경변화 또는 식물종간 차이에 대한 펩타이드의 양적발현 양상의 변화를 측정함으로써 특이 발현 펩타이드를 선별할 수 있다. 본 연구는 혈당강하 수수 종자의 펩타이드를 탐색하여 특성화하고, 특이 발현 펩타이드를 선별하기 위하여, 농촌진흥청에서 선별된 혈당강하 수수 7품종과 대조품종 5품종에 대한 종자 펩타이드 프로파일링을 SELDI-TOF MS 기법을 활용하여 실시하였다.

재료 및 방법

시료 및 측정장비

본 과제의 혈당강하 수수품종의 종자 저분자 단백질 프로파일링 및 펩타이드 마커군 탐색에 사용된 수수 종자는 2011년 농촌진흥청에서 육성된 혈당강하 관련 육성 수수 계통 12종으로 혈당강하 수수 7계통: 135001, 135002, 135003, 135007, 135028, 135030, 135029, 및 비 혈당강하 대조구 수수 5계통 : 135004, 135005, 135006, 135008, 135009으로 하였으며, 0.5 mm로 균일하게 마쇄하여 4°C에서 저장한 시료를 사용하였다(Fig. 1). 단백질 함량 측정에는 UV-Spectrophotometer (MECASYS, Korea)를 사용하였고, 펩타이드 분석에는 SELDI-TOF MS (BIO-RAD, USA)을 사용하였다.

단백질 추출 및 단백질 정량

총 단백질 추출은 미세하게 마쇄한 잡곡 종자 0.1 g에 12.5 mM sodium borate, pH 10.0 (2% β-ME, 1% triton

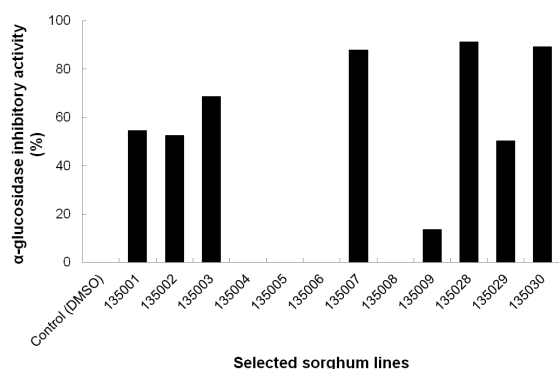


Fig. 1. Inhibition effect of α-glucosidase in selected 12 sorghum resources (hypoglycemic sorghum 7 lines : 135001, 135002, 135003, 135007, 135028, 135030, 135029, Non-hypoglycemic sorghum 5 lines: 135004, 135005, 135006, 135008, 135009).

X-100) 1 ml를 넣은 후 4°C에서 180 rpm으로 1시간동안 흔들고, 4°C에서 12,000 x g로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 falcon tube에 옮겨 담는 과정을 3회 반복하여 얻었다 (Hamaker *et al.*, 1995; Park & Bean, 2003; Park *et al.*, 2013). 총 단백질 함량은 Bradford 분석법을 적용하였다(Bradford, 1976). 단백질 추출액은 펩타이드 프로파일링을 위한 SELDI-TOF MS에 즉시 분석되었다. SELDI-TOF MS 분석의 반복은 단백질 추출 6반복을 두어 실시하였다.

수수종자 펩타이드 프로파일링

펩타이드 분석시료 전처리

수수종자 펩타이드 프로파일링의 분석은 Park *et al.* (2013)의 방법에 따라 실시되었다. 수수 종자 단백질 추출 시료를 시료 바인딩 버퍼에 20배 희석한 후 4°C에 보관한다. 단백질 칩의 최적화를 위하여 시료 바인딩 버퍼를 200 μ l를 취하여 well에 첨가하여 실온에서 250 rpm으로 5분 교반 후 바인딩 버퍼를 제거하였다. 위와 같은 방법으로 1회 반복을 하였다. 바인딩 버퍼가 제거된 단백질 칩에 희석된 단백질 시료를 150 μ l 취하여 well에 첨가하여 실온에서 30분간 250 rpm으로 교반하였다. 단백질 칩에 결합이 안 된 단백질의 세정은 바인딩 버퍼 200 μ l를 취하여 well에 첨가하여 실온에서 5분간 250 rpm으로 흔들어 실시하였다. 이와 같은 방법을 2회 반복하였다. HPLC용 증류수로 2회 세정 과정을 반복하여 남아있던 바인딩 버퍼를 제거하였다. 단백질 칩을 완전히 건조시킨 후 EAM를 1 μ l씩 첨가하여 결정체를 형성하도록 하였다. EAM 첨가를 1회 더 반복하였다. EAM은 1~15 kD를 분석에 용이한 CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)를 50% CHCA EAM solution (50% ACN, 0.25% TFA)으로 용해하여 실온에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 상등액을 사용하였다. 최종적으로 EAM이 첨가된 단백질 칩을 완전히 건조시킨 후 SELDI-TOF MS 분석을 실시하였다.

Data 선택

All-in-One peptide standard를 이용하여 질량을 보정하였다. TOF 스펙트럼은 focus mass 5,000 Da, Matrix attenuation 1,000 Da, sample rate 800 MHz으로 low mass protein protocol을 이용하여 생성하였다. 레이저 에너지의 설정은 EAM-CHCA로 최적화하여 2,500 nJ을 조사하였다. Peak의 검출과 군집 분석은 ProteinChip Data manager를 이용하였다. 분자량 1,000 Da이하의 peak는 EAM에 의해 다른 화학적 물질로 오염이 되어 제거하였다. 스펙트럼은 1,000 Da에서 30,000 Da로 표준화하였다. Peak 검출에서 first-pass peak 검출은 S/N의 비

율을 5, valley depth는 3으로 설정하였고, second-pass peak의 검출은 S/N의 비율을 2, valley depth는 2의 신호로 설정하였다. Estimated peak는 At cluster center로 설정하였다.

통계분석

품종 간의 peak 세기의 차이는 Biorad에서 제공하는 Protein Chip Data Manager Software을 이용하여 분석하였다. 단별량 분석으로 Kruskal-Wallis test로 이용하여 p 값 0.01이하인 경우를 품종간의 유의성을 판정하였다. 다별량 분석으로 p 값 0.01이하의 peak를 적용하여 supervised hierarchical heat map을 이용하여 12 계통 간 군집화를, 혈당강하군 간 군집화를 하였다.

결과 및 고찰

수수 종자의 펩타이드 프로파일링

농촌진흥청에서 육성된 혈당 강하 수수 7계통과 비 혈당 강하 5계통 종자의 펩타이드 스펙트럼을 SELDI-TOF MS의

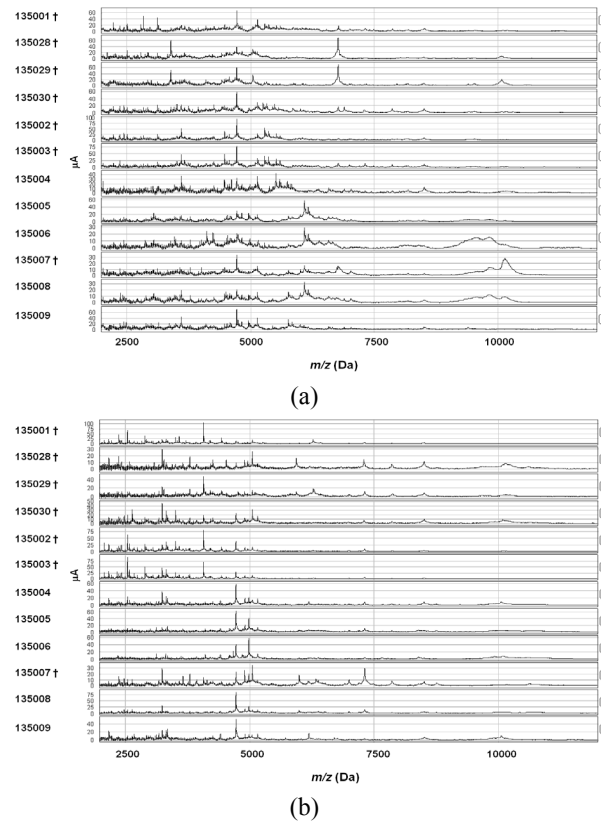


Fig. 2. Peptide peak spectra of two protein chip arrays, CM10 (a) and Q10 (b) of SELDI-TOF MS in twelve sorghum lines. †hypoglycemic sorghum lines, M/Z: mass per charge.

Table 1. Peptide peak cluster detected on CM10 array on the mass range from 2 to 20 kDa in twelve sorghum lines.

Peak cluster	<i>p</i> -value	<i>M/Z</i> ‡		Intensity		Peak cluster	<i>p</i> -value	<i>M/Z</i> ‡		Intensity	
		mean	CV (%)	mean	CV (%)			mean	CV (%)	mean	CV (%)
1	0.000075	2030.86	0.05	12.9	59.4	40	0.000008	5059.68	0.18	11.5	79.5
2	0.001355	2116.79	0.08	7.0	176.4	41	0.000015	5104.65	0.06	16.5	46.9
3	0.000000	2231.53	0.02	11.5	70.9	42	0.000016	5146.82	0.03	25.2	49.5
4	0.000720	2247.92	0.06	10.4	47.1	43	0.000000	5167.72	0.04	15.1	49.4
5	0.008853	2373.00	0.14	13.7	60.4	44	0.000000	5253.43	0.07	5.6	129.6
6	0.000032	2453.52	0.03	16.3	57.3	45	0.000000	5296.01	0.02	13.6	124.6
7	0.000028	2502.27	0.06	11.2	65.6	46	0.000000	5319.18	0.03	9.9	103.5
8	0.000000	2520.07	0.02	10.3	84.8	47	0.000000	5335.33	0.04	9.0	94.7
9	0.000008	2795.06	0.11	8.3	111.9	48	0.000000	5373.00	0.04	10.9	123.5
10	0.000000	2845.37	0.02	10.1	102.9	49	0.000000	5393.64	0.01	8.5	110.4
11	0.034269	2889.54	0.14	11.0	55.3	50	0.000001	5458.58	0.09	8.9	57.0
12	0.000046	2924.84	0.03	11.1	58.6	51	0.000000	5498.82	0.01	6.7	87.6
13	0.000050	3047.32	0.20	7.8	69.1	52	0.000000	5519.05	0.02	7.1	137.9
14	0.000001	3132.89	0.03	16.5	61.1	53	0.000000	5533.25	0.04	10.2	110.3
15	0.000000	3155.53	0.13	10.3	53.8	54	0.000000	5552.10	0.07	6.3	103.7
16	0.000057	3368.20	0.04	6.7	105.0	55	0.000000	5630.26	0.31	9.9	86.5
17	0.000041	3397.97	0.10	13.7	101.8	56	0.000000	5769.25	0.14	9.8	107.9
18	0.000104	3477.07	0.01	8.7	53.2	57	0.000001	5855.08	0.16	8.3	81.9
19	0.000871	3496.33	0.03	9.1	63.8	58	0.000030	5905.05	0.29	5.9	86.2
20	0.000100	3522.81	0.12	13.6	40.4	59	0.000000	6009.90	0.05	8.1	81.6
21	0.000143	3583.44	0.12	7.4	70.7	60	0.000000	6046.88	0.05	6.7	56.9
22	0.000012	3611.09	0.09	22.8	66.8	61	0.000000	6091.55	0.11	11.5	102.5
23	0.000000	3677.23	0.10	12.8	64.5	62	0.000000	6121.80	0.03	8.2	83.0
24	0.043222	3791.46	0.09	11.9	34.9	63	0.000000	6174.39	0.09	8.0	101.8
25	0.000047	3953.27	0.08	6.6	79.9	64	0.000016	6377.67	0.38	5.7	51.2
26	0.024434	4019.57	0.03	7.5	40.1	65	0.000030	6540.03	0.02	3.0	57.7
27	0.000003	4112.78	0.27	15.8	58.4	66	0.000000	6590.45	0.08	5.5	77.0
28	0.001117	4261.92	0.32	14.3	46.0	67	0.000000	6638.20	0.19	3.2	103.2
29	0.000000	4434.37	0.15	8.6	72.5	68	0.000000	6773.50	0.20	14.7	112.1
30	0.000002	4488.83	0.02	19.8	59.1	69	0.000003	6902.26	0.17	4.8	80.4
31	0.001499	4514.17	0.08	11.9	57.9	70	0.000175	7043.69	0.36	5.3	41.9
32	0.000625	4540.14	0.04	17.5	30.7	71	0.000002	7194.89	0.16	2.6	79.0
33	0.000052	4581.54	0.11	15.8	42.9	72	0.000004	7317.42	0.12	4.3	89.0
34	0.000011	4615.88	0.14	11.8	55.8	73	0.000115	7876.93	0.08	3.7	96.5
35	0.000009	4732.26	0.04	42.9	55.9	74	0.000047	8002.89	0.36	3.2	42.3
36	0.000185	4753.50	0.08	18.0	35.6	75	0.000097	8184.17	0.25	3.8	40.1
37	0.000003	4834.49	0.12	14.7	44.4	76	0.001762	8401.00	0.25	2.1	61.6
38	0.000000	4968.00	0.02	9.8	77.1	77	0.014088	8515.84	0.09	6.0	58.1
39	0.000000	4993.26	0.14	12.2	49.2	78	0.000016	8814.22	0.50	0.9	98.0

Table 1. Peptide peak cluster detected on CM10 array on the mass range from 2 to 20 kDa in twelve sorghum lines (continue).

Peak cluster	<i>p</i> -value	<i>M/Z</i> ‡		Intensity		Peak cluster	<i>p</i> -value	<i>M/Z</i> ‡		Intensity	
		mean	CV (%)	mean	CV (%)			mean	CV (%)	mean	CV (%)
79	0.000001	9106.29	0.28	1.5	100.9	92	0.000003	13305.97	0.11	1.1	90.1
80	0.000002	9414.56	0.11	4.0	61.4	93	0.000000	13462.14	0.18	1.0	125.4
81	0.000000	9555.34	0.25	4.8	69.6	94	0.000001	14098.34	0.52	0.7	119.6
82	0.000000	9848.30	0.08	4.3	153.9	95	0.000919	14583.24	0.10	0.2	134.4
83	0.000000	10102.62	0.27	7.1	101.3	96	0.003210	14792.68	0.51	0.2	74.7
84	0.000000	10212.76	0.34	4.7	120.9	97	0.000033	15443.99	0.58	0.3	119.4
85	0.001517	10672.91	0.26	0.7	86.4	98	0.000002	15933.44	0.77	0.4	84.4
86	0.000022	10951.48	0.34	0.8	78.6	99	0.000811	16443.71	0.36	0.1	112.5
87	0.000008	11312.26	0.30	1.3	99.5	100	0.107731	16922.98	0.66	0.2	64.6
88	0.000025	11627.91	0.04	0.3	137.5	101	0.001048	17385.08	0.09	0.1	91.6
89	0.000029	11902.15	0.29	0.4	84.4	102	0.000027	18310.02	0.81	0.3	82.0
90	0.000180	12321.01	0.50	0.9	84.6	103	0.000000	19140.50	0.26	1.1	148.1
91	0.000000	12710.79	0.31	1.2	77.0	104	0.000000	19730.03	0.57	1.9	154.8

†Cluster in bold represents significantly different peak clusters ($p < 0.01$) among the twelve sorghum lines.

‡*M/Z*: mass per charge

Table 2. Peptide peak cluster detected on Q10 array on the mass range from 2 to 20 kDa in twelve sorghum lines.

Peak cluster	<i>p</i> -value	<i>M/Z</i> ‡		Intensity		Peak cluster	<i>p</i> -value	<i>M/Z</i> ‡		Intensity	
		mean	CV (%)	mean	CV (%)			mean	CV (%)	mean	CV (%)
1	0.000001	2083.22	0.09	11.7	94.3	21	0.000000	3129.36	0.02	4.7	95.0
2	0.000859	2159.43	0.12	4.5	65.2	22	0.000002	3184.31	0.03	9.6	58.2
3	0.000000	2181.00	0.03	13.9	68.6	23	0.000056	3250.65	0.02	29.3	46.9
4	0.005650	2237.37	0.03	8.3	49.1	24	0.000001	3266.87	0.07	10.2	46.6
5	0.000004	2350.17	0.02	8.2	65.1	25	0.000001	3286.49	0.04	6.9	55.0
6	0.000015	2383.76	0.07	11.5	66.9	26	0.000084	3323.10	0.04	10.1	37.1
7	0.000001	2401.74	0.02	6.1	73.0	27	0.000000	3339.97	0.02	19.7	81.1
8	0.000006	2434.96	0.08	10.9	55.2	28	0.000001	3358.46	0.13	12.9	51.1
9	0.000000	2489.51	0.02	5.0	120.8	29	0.000000	3520.60	0.03	15.2	93.5
10	0.000000	2560.57	0.07	24.2	88.2	30	0.000000	3593.91	0.03	7.8	84.8
11	0.000000	2593.83	0.02	10.2	105.9	31	0.000007	3669.82	0.09	7.0	49.0
12	0.000032	2608.78	0.02	5.6	65.9	32	0.000002	3723.74	0.01	3.3	129.5
13	0.000000	2645.47	0.03	9.3	86.3	33	0.000000	3808.91	0.02	10.4	59.7
14	0.000000	2690.62	0.02	7.7	74.5	34	0.000001	3934.91	0.26	7.4	28.3
15	0.000002	2747.79	0.02	5.1	90.0	35	0.000000	4078.68	0.01	33.9	132.8
16	0.000000	2907.95	0.01	11.5	113.5	36	0.000012	4105.50	0.19	12.5	107.4
17	0.000005	2934.40	0.22	9.1	54.6	37	0.000015	4148.88	0.11	4.9	56.0
18	0.019664	2966.74	0.15	5.5	75.8	38	0.000000	4210.70	0.04	8.1	78.4
19	0.014688	3018.71	0.11	5.7	63.0	39	0.000000	4226.43	0.04	8.2	61.7
20	0.000000	3063.57	0.01	5.6	106.5	40	0.000001	4269.50	0.08	6.6	56.6

Table 2. Peptide peak cluster detected on Q10 array on the mass range from 2 to 20 kDa in twelve sorghum lines (continue).

Peak cluster	<i>p</i> -value	<i>M/Z</i> ‡		Intensity		Peak cluster	<i>p</i> -value	<i>M/Z</i> ‡		Intensity	
		mean	CV (%)	mean	CV (%)			mean	CV (%)	mean	CV (%)
41	0.000000	4423.36	0.04	7.0	44.2	69	0.000769	6712.16	0.07	1.3	80.6
42	0.000000	4441.31	0.02	8.9	107.3	70	0.000059	6792.84	0.19	1.1	108.5
43	0.000000	4457.49	0.02	5.5	106.0	71	0.000003	7005.81	0.11	3.7	52.1
44	0.000000	4537.12	0.01	4.7	80.1	72	0.000002	7207.54	0.04	2.2	52.5
45	0.000002	4603.07	0.02	4.8	86.1	73	0.000001	7318.43	0.07	9.8	62.8
46	0.000000	4625.82	0.01	3.7	91.9	74	0.000000	7677.72	0.12	1.0	100.0
47	0.000000	4679.03	0.01	5.5	110.3	75	0.000000	7870.43	0.03	3.5	63.2
48	0.000001	4733.66	0.05	39.3	65.8	76	0.000411	8221.25	0.12	0.9	65.0
49	0.000000	4747.97	0.02	15.2	64.8	77	0.000000	8400.84	0.01	2.2	75.9
50	0.000210	4769.37	0.01	9.2	39.3	78	0.000014	8515.08	0.03	5.5	45.5
51	0.000001	4912.43	0.08	16.2	46.2	79	0.000000	8769.82	0.13	1.8	75.9
52	0.001204	4970.74	0.02	8.5	24.0	80	0.000012	9234.08	0.04	0.4	111.5
53	0.000000	4993.46	0.02	16.4	93.9	81	0.000004	9664.66	0.13	1.0	124.7
54	0.000010	5051.08	0.10	7.7	40.8	82	0.000001	9909.45	0.33	2.5	86.9
55	0.000000	5064.87	0.04	18.0	58.3	83	0.000001	10102.78	0.38	4.8	69.6
56	0.000002	5174.39	0.23	10.3	42.1	84	0.000000	10629.36	0.10	2.0	62.5
57	0.000148	5279.98	0.10	2.6	109.0	85	0.000000	10816.78	0.40	1.5	67.0
58	0.000000	5454.47	0.03	2.8	69.0	86	0.000003	11399.71	0.40	0.5	76.9
59	0.000003	5727.54	0.03	1.8	69.7	87	0.000057	11962.76	0.30	0.3	67.4
60	0.000113	5825.64	0.10	1.6	84.1	88	0.000000	12716.59	0.21	1.0	81.1
61	0.000001	5947.51	0.03	2.9	155.2	89	0.000000	12846.00	0.09	0.7	57.8
62	0.000001	6002.47	0.05	4.7	84.7	90	0.000000	13471.90	0.23	0.5	139.3
63	0.000000	6187.52	0.34	5.4	96.8	91	0.000954	14020.21	0.23	0.1	109.5
64	0.000046	6281.79	0.02	5.1	145.7	92	0.000000	14764.20	0.70	0.3	60.3
65	0.000012	6298.97	0.01	4.1	124.5	93	0.000016	16128.66	1.17	0.1	50.2
66	0.000000	6348.10	0.06	3.6	94.3	94	0.000008	16803.58	0.32	0.2	53.4
67	0.000000	6403.61	0.28	3.9	69.4	95	0.000002	19697.32	0.32	0.8	71.0
68	0.000000	6518.52	0.17	2.6	80.5						

†Cluster in bold represents significantly different peak clusters (*p* < 0.01) among the twelve sorghum lines.

‡*M/Z*: mass per charge

CM10 (weak cation exchanger)와 Q10 (strong anion exchanger) protein chip array을 활용하여 측정하였다(Fig. 1). CM10과 Q10 에서 분자량 10 kDa 이하의 수수 종자에서 검출된 펩타이드 피크 스펙트럼은 수수 12계통에서 각각 다르게 나타나, 계통 간 종자에서 유래되는 펩타이드의 양적 또는 질적 발현에 차이가 있음을 제시하였다. 종자 펩타이드의 발현이 품종 간 차이가 있다는 연구결과는 SELDI-TOF MS 기법을 활용한 쌀 품종비교에서 보고되었으며, 품종별 특이

적으로 발현하는 10 kDa 이하의 펩타이드가 품종 식별의 바이오마커로 선정되었다(Park *et al.*, 2013). 분자량 10 kDa 이하의 펩타이드의 양적발현은 겔 기반 전기영동 기법으로는 측정하기는 쉽지 않지만, SELDI-TOF MS 기법은 20 kDa 이하의 저분자 단백질을 검출하는데 큰 장점을 갖고 있어 (Issaq *et al.*, 2002), 종자 및 식물체 유래 펩타이드의 양적 또는 질적 발현 및 탐색에 유효하게 적용될 것으로 사료된다.

수수 12계통 종자에서 검출된 펩타이드 피크의 종류(peak

cluster), 질량(*M/Z*) 및 양적발현 정도(peak intensity)는 Table 1과 Table 2에 있다. 분자량의 범위가 2~20 kDa에서 검출된 수수 12계통 종자의 펩타이드는 CM10에서 104개 (Table 1)와 Q10에서 95개였다(Table 2). 펩타이드 양적발현에서 12계통 간 유의성($p < 0.01$)을 보인 펩타이드는 CM10에서 99개와 Q10에서 93개로 나타나, 20 kDa이하에서 검출된 대부분의 펩타이드가 계통 간 양적 차이를 나타내었다 (Table 1과 2에서 굵은체로 된 피크 클러스터). 이러한 결과는 수수 각 계통 종자에서 유래되는 특이적인 펩타이드가 존재하며, 고유한 펩타이드 프로파일이 있음을 제시하고 있다.

수수 종자의 펩타이드를 이용한 계통식별

수수 계통 간 펩타이드의 양적발현에서 유의성을 갖는 펩타이드를 적용한 Heat map 분석은 각 수수 계통에서 높게 (붉은색, up-regulate) 또는 낮게(녹색, down-regulate) 발현된 펩타이드를 잘 보여주고 있다(Fig. 3). 또한 Heat map은 유의성이 있는 펩타이드를 이용한 계통 간 근연관계(vertical grouping)를 보여주고 있다. 흥미로운 결과는 CM10과 Q10

모두에서 각 계통의 반복 간 근연거리가 가까운 위치에 모여 있어, 이는 측정 반복 간 차이가 적었음을 의미하였다.

수수 12계통간의 근연거리를 이용한 군집분석에서 CM10의 경우, 12계통은 크게 3개의 군집을 형성하였다. 계통번호 ‘135001’, ‘135002’, ‘135003’, ‘135028’, ‘135029’, 및 ‘135030’이 한 군집을, ‘135004’와 ‘135009’가 두 번째 군집을, ‘135004’, ‘135005’, ‘135007’ 및 ‘135008’이 세 번째 군집을 형성하였다. 흥미롭게도 혈당 강하 수수로 선정된 계통 ‘135007’을 제외한 나머지 혈당 강하 수수 6계통 ‘135001’, ‘135002’, ‘135003’, ‘135028’, ‘135029’, 및 ‘135030’이 한 군집으로 분리되었다는 것이다. 이러한 혈당 강하 계통의 군집은 Q10의 결과에서 더욱 뚜렷하게 나타났다. CM10에서 비 혈당 강하 군집으로 분리된 ‘135007’이 Q10에서는 혈당 강하 계통 군집으로 형성하였고, 비 혈당 강하 계통들이 다른 한 군집을 형성하였다. 이는 혈당 강하 계통과 비 혈당 강하 계통에서 특이적으로 발현되는 고유의 펩타이드가 각각 존재함을 제시하고 있다.

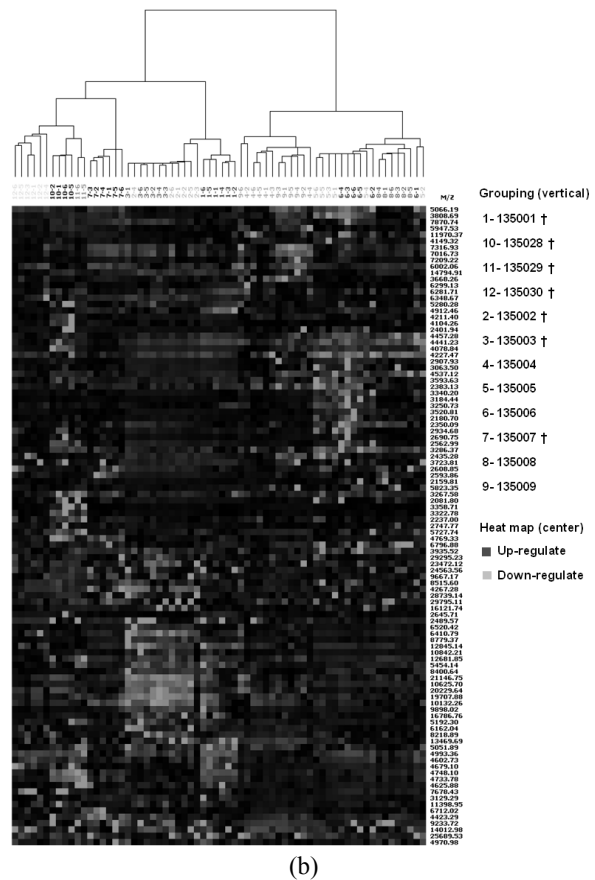
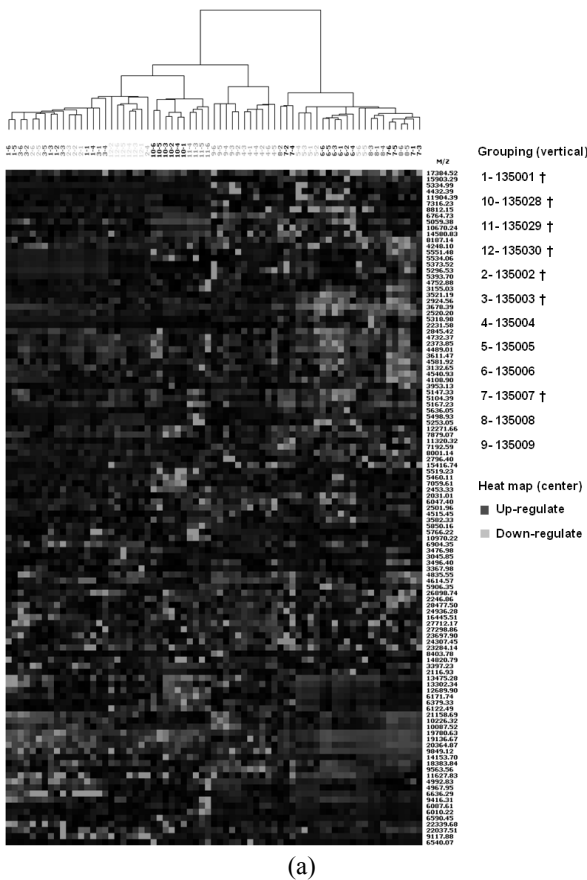


Fig. 3. Heat map analysis using peaks of $p < 0.01$ detected on CM10 (A) and Q10 (B) arrays in twelve sorghum lines. †hypoglycemic sorghum lines, *M/Z*: mass per charge

Table 3. Significantly different peptide peak ($p < 0.00001$) between non-hypoglycemic and hypoglycemic sorghum lines detected on CM10 array.

Index	p-value	M/Z†		Intensity	
		mean	CV (%)	mean	CV (%)
1	0.0000000046	2231.57	0.02	11.5	71.2
2	0.0000001099	2520.07	0.02	10.3	84.8
3	0.0000001525	2845.37	0.02	10.1	102.9
4	0.0000000351	3132.89	0.03	16.5	61.1
5	0.0000000203	4993.24	0.03	11.4	50.9
6	0.0000000604	5295.93	0.02	13.6	124.0
7	0.0000006190	5373.13	0.03	10.8	124.3
8	0.0000002908	5775.80	0.04	9.0	104.9
9	0.0000098427	6173.69	0.05	7.9	102.3
10	0.0000000403	6589.99	0.03	5.5	76.8
11	0.0000056061	7318.30	0.09	4.3	89.4
12	0.0000066471	9415.52	0.08	4.0	61.5
13	0.0000029703	12738.63	0.09	1.1	81.8

†M/Z: mass per charge

Table 4. Significantly different peptide peak ($p < 0.00001$) between non-hypoglycemic and hypoglycemic sorghum lines detected on Q10 array.

Index	p-value	M/Z†		Intensity	
		mean	CV (%)	mean	CV (%)
1	0.0000000042	2383.76	0.07	11.5	66.9
2	0.0000000045	2401.74	0.02	6.1	73.0
3	0.0000000078	2907.95	0.01	11.5	113.5
4	0.0000000572	3063.57	0.01	5.6	106.5
5	0.0000000002	3129.36	0.02	4.7	95.0
6	0.0000000019	3520.60	0.03	15.2	93.5
7	0.0000001012	3593.91	0.03	7.8	84.8
8	0.0000000178	3808.91	0.02	10.4	59.7
9	0.0000003512	4078.68	0.01	33.9	132.8
10	0.0000000067	4226.43	0.04	8.2	61.7
11	0.0000000036	4441.31	0.02	8.9	107.3
12	0.0000000022	4537.12	0.01	4.7	80.1
13	0.0000000039	4747.97	0.02	15.2	64.8
14	0.0000000097	4993.46	0.02	16.4	93.9
15	0.0000000001	5065.00	0.05	18.1	57.3
16	0.0000004020	6200.20	0.04	5.6	88.0

†M/Z: mass per charge

혈당 강하 수수 종자의 특이적 발현 펩타이드 분석

수수 12계통을 혈당 강하 계통군과 비 혈당 강하 계통군의 2군으로 분류하여 펩타이드의 양적 발현을 비교하였다. 분자량의 범위가 2~20 kDa에서 검출된 펩타이드 양적발현에서 2군 간 유의성($p < 0.01$)을 보인 펩타이드는 CM10에서 26개와 Q10에서 29개였다. 그러나 $p < 0.01$ 의 유의성이 있는 펩타이드의 Heat map 군집 분석 결과는 CM10과 Q10 모두에서 혈당 강하군과 비 혈당 강하군을 군집화하지 못하였다. 혈당 강하군과 비 혈당 강하군의 군집화는 $p < 0.00001$ 의 유의성이 있는 펩타이드로 가능하였으며(Fig. 4), 혈당 강하 계통 ‘135007’은 CM10에서는 비 혈당 강하군으로 되었으나, Q10에서는 혈당 강하군으로 군집화 되었다. $p < 0.00001$ 의 유의성이 있는 펩타이드는 CM10에서는 13개(Table 3)와 Q10에서는 16개(Table 4)가 선정되었다.

수수 혈당 강하 계통군에서 특이적으로 양적발현이 높은 펩타이드를 분석하기 위하여, 혈당 강하군과 비 혈당 강하군 간 $p < 0.00001$ 수준에서 유의성이 있는 29개 펩타이드(CM10의 13개와 Q10의 29개)를 group scatter plot 으로 양적발현을 비교 분석하였다(Fig. 5). 분석결과, 분자량이 5 kDa 이하에서 총 10종의 펩타이드가 선정되었다. CM10에서는 분자량이 2231.57, 2845.42, 3132.64, 5296.52, 5375.51 Da을 포함한 5종이, Q10에서는 분자량이 2907.92, 3063.49, 3520.81, 4078.83, 5066.18 Da의 5종의 펩타이드가 수수 혈당 강하 계통 군에서만 특이적으로 양적발현이 높은 펩타이드로 선정되었다.

본 연구의 SELDI-TOF MS 기법을 활용한 수수 종자의 펩타이드를 분석한 결과, 수수 12 계통은 각각의 고유한 종자 유래 펩타이드 프로파일과 유의성이 있게 발현하는 특이적 펩타이드가 존재하였으며, 고유한 펩타이드 프로파일을 이용한 품종 및 계통의 식별과 선별에 적용할 수 있음을 시사하고 있다. 또한 혈당 강하 계통과 비 혈당 강하 계통의 펩타이드 분석을 통하여 2개의 군이 서로 다른 군집으로 분류되었으며, 이는 혈당 강하 계통과 관련된 특이적으로 발현하는 일련의 펩타이드군이 있음을 제시하였다. 혈당 강하 계통에서 유의성($p < 0.00001$) 이 있게 발현되는 펩타이드를 29개 선정하였으며, 이중에서 펩타이드의 양적 발현이 혈당 강하 계통에서만 공통적으로 높은 10개의 펩타이드가 선별되었다. 따라서 이들 펩타이드는 혈당 강하 수수 품종의 선별에 종자 펩타이드를 기반으로 한 바이오마커로 이용할 수 있음을 제시하였다.

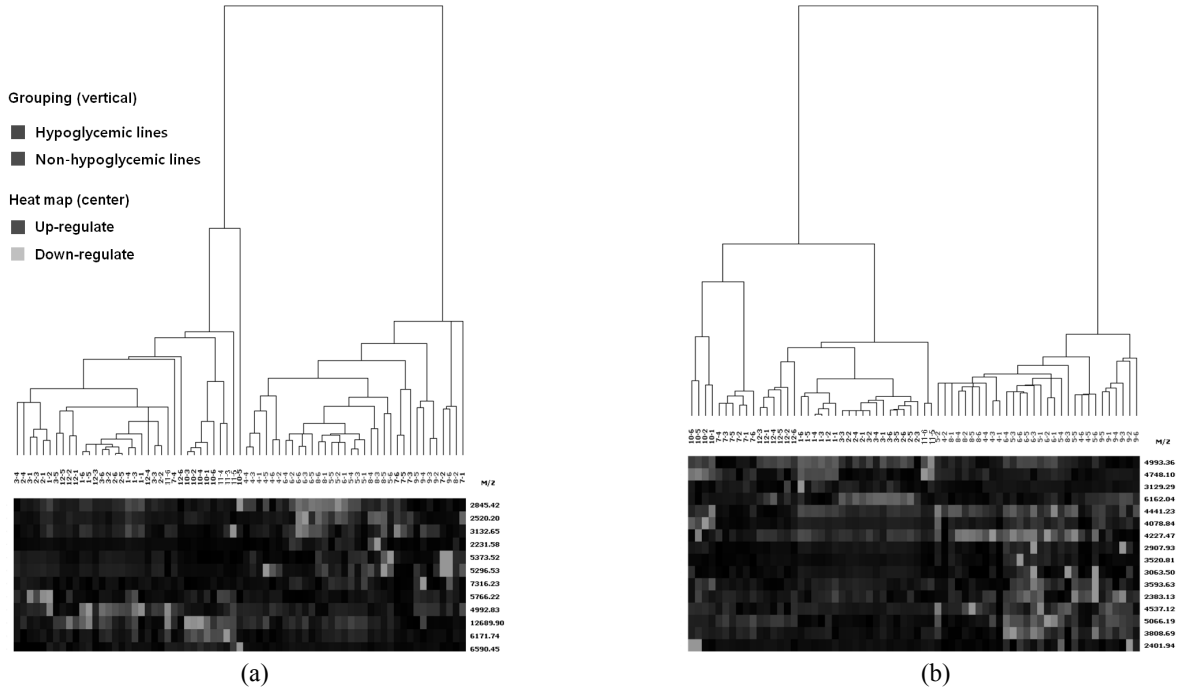


Fig. 4. Heat map analysis using peaks of $p < 0.00001$ between non-hypoglycemic and hypoglycemic sorghum lines detected on CM10 (A) and Q10 (B) arrays. M/Z : mass per charge.

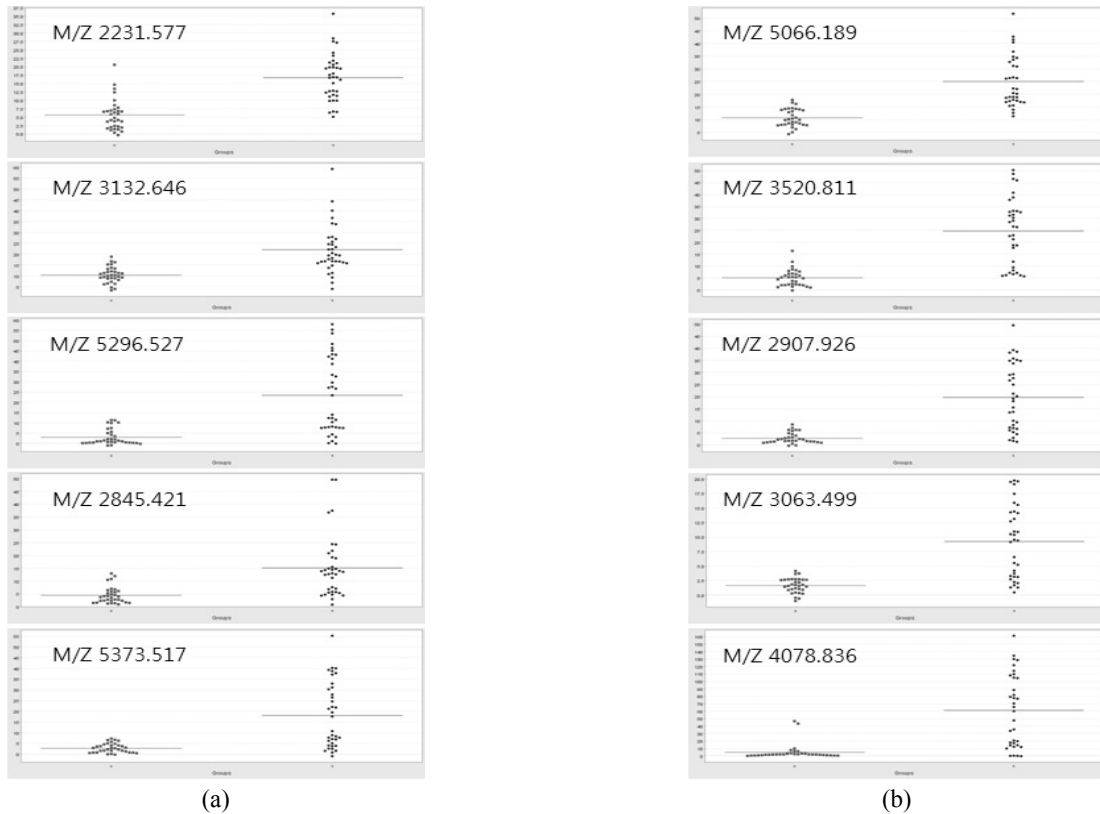


Fig. 5. Group scatter plots of selected potential peptide biomarkers ($p < 0.00001$) for hypoglycemic sorghum detected on CM10 (A) and Q10 (B) arrays. Left : Non-hypoglycemic, Right : Hypoglycemic sorghums, M/Z : mass per charge.

적 요

혈당 강하를 목적으로 선별된 수수계통의 종자 유래 펩타이드의 양적, 질적 형질을 특성화하고 혈당 강하 수수에서 특이적으로 발현 펩타이드를 선별하기 위하여, 혈당 강하 수수 7계통과 비 혈당 강하 수수 5계통에 대한 종자 펩타이드 프로파일링을 SELDI-TOF MS 기법을 활용하여 분석하였다.

1. 분자량의 범위가 2~20 kDa에서 검출된 수수 12계통 종자의 펩타이드는 CM10 (weak cation exchanger)에서 104개와 Q10 (strong anion exchanger)에서 95개였으며, 펩타이드 양적발현에서 12계통 간 유의성($p < 0.01$)을 보인 펩타이드는 CM10에서 99개와 Q10에서 93개였다.
2. 12계통 간 양적 발현에 유의적($p < 0.01$) 펩타이드를 이용한 heat map 분석에서 수수 각 계통 종자의 고유한 펩타이드 프로파일과 특이적으로 발현하는 펩타이드를 제시하고 있다.
3. 수수 12계통간의 근연거리를 이용한 군집분석에서 혈당 강하 수수 7계통과 비 혈당 강하 수수 5계통이 서로 다른 2개의 군집을 형성하였다.
4. 혈당 강하 계통에서 유의성($p < 0.00001$)이 있게 발현되는 펩타이드를 29개 선정하였으며, 이 중에서 혈당 강하 계통에서만 공통적으로 높게 발현된 10개의 펩타이드(분자량이 2231.6, 2845.4, 2907.9, 3063.5, 3132.6, 3520.8, 4078.8, 5066.2, 5296.5, 5375.5 Da)를 선별하였다.

사 사

이 논문은 2013년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2012R1A1A2004847).

인용문헌(REFERENCES)

- Belton, P. S. and J. R. N. Taylor. 2004. Sorghum and millets: protein sources for Africa. *Trends in Food Science & Technology* 15 : 94-98.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-54.
- Camargo Filho, I., D. A. G. Cortez, T. Ueda-Nakamura, C. V. Nakamura, and B. P. Dias Filho. 2008. Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*. *Phytomedicine* 15 : 202-8.
- Dykes, L. and L. W. Rooney. 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J Cereal Sci.* 44 : 236-251.
- Emami, K., N. J. Morris, S. J. Cockell, G. Golebiowska, Q. Y. Shu, and A. M. Gatehouse. 2010. Changes in protein expression profiles between a low phytic acid rice (*Oryza sativa* L. Ssp. japonica) line and its parental line: a proteomic and bioinformatic approach. *J Agric Food Chem* 58 : 6912-22.
- Farrokhi, N., J. P. Whitelegge, and J. A. Brusslan. 2008. Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnol J.* 6 : 105-34.
- Hamaker, B. R., A. A. Mohamed, J. E. Habben, C. P. Huang, and B. A. Larkins. 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chem* 72 : 583-588.
- Hartmann, R. and H. Meisel. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol* 18 : 163-9.
- Issaq, H. J., T. D. Veenstra, T. P. Conrads, and D. Felschow. 2002. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 292 : 587-92.
- Jeon, H. S., I. M. Chung, K. H. Ma, E. H. Kim, S. J. Young, and J. K. Ahn. 2011. Analysis of Phenolic Compounds in Sorghum, Foxtail Millet and Common Millet. *Korean J Crop Sci.* 56 : 361-74.
- Kamath, V., S. Niketh, A. Chandrashekar, and P. S. Rajini. 2007. Chymotryptic hydrolysates of α -kafirin, the storage protein of sorghum (*Sorghum bicolor*) exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activity. *Food Chem* 100 : 306-311.
- Ki, H. Y., E. S. Seong, B. K. Ghimire, I. M. Chung, S. S. Kwon, E. J. Goh, K. Heo, M. J. Kim, J. D. Lim, D. Lee, and C. Y. Yu. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem* 115 : 12341-239.
- Kim, W. S., S. Jang, and H. B. Krishnan. 2012. Accumulation of Leginsulin, a Hormone-Like Bioactive Peptide, is Drastically Higher in Asian than in North American Soybean Accessions. *Crop Sci.* 52 : 262-71.
- Mincoff, P. C., D. A. Garcia Cortez, T. Ueda-Nakamura, C. V. Nakamura, and B. P. Dias Filho. 2006. Isolation and characterization of a 30kD antifungal protein from seeds of *Sorghum bicolor*. *Research in Microbiology* 157 : 326-332.
- Ndao, M., A. Rainczuk, M. C. Rioux, T. W. Spithill, and B. J. Ward. 2010. Is SELDI-TOF a valid tool for diagnostic biomarkers? *Trends in Parasitology* 26 : 561-67.
- Ng, T. B. 2004. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides* 25 : 1215-22.
- Park, J. H., S. H. Lee, I. M. Chung, and Y. Park. Sorghum extract exerts an anti-diabetic effect by improving insulin sensitivity via PPAR-gamma in mice fed a high-fat diet.

- Nutr Res Pract 6 : 322-7.
- Park, S. H. and S. R. Bean. 2003. Investigation and optimization of the factors influencing sorghum protein extraction. J Agric Food Chem 51 : 7050-4.
- Park, S. J., J. Y. Park, Y. H. Lee, S. M. Hwang, A. R. Kim, J. Y. Ko, and T. W. Kim. 2013. Optimization of SELDI-TOF MS for Peptide Profiling of Sorghum Seed. Korean J Crop Sci. 58(1) : 50-56
- Park, S. J., Y. H. Lee, Y. J. Nam, B. K. Baik, and T. W. Kim. 2013. Peptide-Based Biomarker Discovery for Identification of Rice Cultivars using Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Crop Sci. 53 : 987-95
- Petricoin, E. F. and L. A. Liotta. 2004. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. Curr Opin Biotechnol 15 : 24-30.
- Povero, G., M. Papale, G. Loreto, A. Alpi, P. Perata, and E. Loreti. 2010. Identification of Grapevine Cultivar Biomarkers Using Surface-Enhanced Laser Desorption and Ionization (SELDI-TOF-MS). Am J Enol Vitic 61 : 492-97.
- Rural Development Administration. 2013. Development of Health Supplement Functional Material for Blood Sugar Decrease in Sorghum.
- Sarmadi, B. H. and A. Ismail. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides 31 : 1949-56.
- Seo, M. S., J. Y. Ko, S. B. Song, J. S. Lee, J. R. Kang, D. Y. Kwak, B. G. Oh, Y. N. Yoon, M. H. Nam, H. S. Jeong, and K. S. Woo. 2011. Antioxidant Compounds and Activities of Foxtail Millet, Proso Millet and Sorghum with Different Pulverizing Methods. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40 : 790-7.
- Silva-Sanchez, C., A. P. de la Rosa, M. F. Leon-Galvan, B. O. de Lumen., A. de Leon-Rodriguez, and E. G. de Mejia. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. J Agric Food Chem 56 : 1233-40.