카놀라 유채유 불포화 지방산 함량증진을 위한 분자육종

허태린
(경북대학교 자연과학대학 유전공학과)

Molecular Breeding of Canola for the Improvement of Unsaturated Fatty Acid Content in Canola Seed Oil

Tae-Lin Huh
Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University,Taegu 702-701, Korea

적 요

다가불포화 지방산들은 식물에 있어서 냉해에 적응할수 있는 능력을 유지시키고 동물세포에 있어서도 적절한 기능을 유지시키는 역할을 한다고 알려져있다. 본 연구에서는 불포화지방산의 일종인 linoleic acid 를 linolenic acid로 전환 시키는 microsomal ω-3 fatty acid desaturase(FAD3)의 유전자를 Arabidopsis cDNA library로 부터 분리 한후 단백질 1차구조 및 유전자 서열을 규명한 결과, 분리된 유전자가 전체 1,823bp로써 1,158bp의 open reading frame을 가지며 Genebank의 data base 분석 결과 Isoenzyme인 delta-12 fatty acid desaturase 및 chloroplast ω-3 fatty acid desaturase와 각각 58%,70%의 유사성을 가지는 Arabidopsis microsomal ω-3 fatty acid desaturase cDNA 임을 확인할수 있었다. 분리확인된 fad3 cDNA를 식물체내에 도입하여 발현 시키기위해 CaMV의 35S dual promoter를 가진 casette vector와 binary vector(pGA482)에 fad3 cDNA를 재조합하여 식물형질 전환용 재조합유전자를 구성하고 *Agrobacterium*을 이용한 식물형질전환 방법에 의하여 형질전환 유채(*B. napus*. Hanla)를 얻었다.

I. 서 론

식물에 존재하는 지질은 극성(polarity)에 따라 polar lipid와 neutral lipid로 나눌 수 있으며 membrane에서는 주로 polar lipid인 phoshpolipid나 galactolipid등이 발견되고 seed의 vagetative oil등에서는 neutral lipid인 triacylglyceride가 발견되는데 이들 모두 지방산 구조를 공히 지니고 있다[1,2]. 지방산은 cytosol이나 plastid에서 생합성되는데 acetyl-CoA를 primer로 이용해서 이것이 caboxylation되면서 malonyl-CoA가 형성되고 이에 malonyl-CoA의 C-2unit 가 연속적으로 첨가되면서 결국 palmitic acid(C16:0)가 생성되는데 이때 fatty acid synthase system이 촉매작용을 한다. C16:0 에서 C18:0의 stearic acid의 전환도 역시 fatty acid synthase의 작용으로 추측되는데 이들 포화지방산으로 부터 oleic acid(18:1), linoleic acid(18:2), linolenic acid(18:3)등의 주요 불포화 지방산으로의 전환은 desaturase system에 의해 이루어 진다. Stearoyl-ACP desaturase는 stearic acid를 oleic acid(ω-9)로 전환시키는 것으로 알려져 있으나 linoleic(ω-6)와 linolenic(ω-3) acid 형성에 관한 desaturase연구는 식물의 경우 최근 발표된 바 있다[3]. 또한 Brassica napus에서 liroleic acid를 linolenic acid로 전환시켜 주는 ω-3 fatty acid desaturase(*fad* 3) 유전자를 Arabidopsis thaliana의 mutant에 도입했을때 얻어진 형질전환 Arabidopsis에서 linolenic acid의 함량이 wild type 수준으로 증가된다는 보고도 있다[4]. 그러므로 본인은 위와 같은 사실을 이용하여 현재 식용유 추출의 주요 재료인 canola plant에 *fad* 3 유전자를 도입하여 trangenic canola plant를 분자육종하고

이들로 부터 canola 유체유내의 linolenic acid함량을 증가시킴으로서 불포화도를 증가시키고자 한다.

식물성 식용유는 동물성 지방과는 달리 대부분이 불포화 지방산으로 구성되어있으며 이에 따라 다양한 용도의 식품제조 및 가공에 널리 사용되고 있으므로 식생활 구조의 서구화에 따라 매년 소모량이 증가되고 있다. 현재 사용되고 있는 대표적인 식용유로서는 카놀라유(canola oil), 대두유(soybean oil), 그리고 옥배유(corn oil) 등이 전세계 식용유 소모량의 약 90% 이상을 차지하고 있다. 이들중 대두유와 옥배유는 포화지방산의 함량이 각기 15%와 13%로, 카놀라유의 6%보다는 2-3 배 높은 것으로 나타나 포화지방산의 함량이 상대적으로 낮은 카놀라유의 수요가 최근 급속도로 증가되고 있다. 또한 카놀라유에는 불포화 지방산이 94%로 식용유중에 불포화지방산의 함량이 가장 높으며 불포화지방산 구성으로서는 단일 불포화산의 oleic acid와 다중 불포화 지방산들로서 불포화도가 두개인 linoleic acid 및 불포화도가 세개인 linolenic acid 들로서 구성되어 있다. 또한 이들 다중불포화 지방산들 중에서는 linoleic acid가 26% 그리고 linolenic acid는 10%로 존재하고있어 비교적 불포화도가 세개인 linolenic acid의 함량이 낮게 나타나고 있다. 그러므로 불포화도가 보다 증가된 고품질의 canola유의 개발을 위해서는 최근 ω-3 fatty acid로 알려져 각광을 받고 있는 linolenic acid 의 함량을 증가시키는것이 바람직하다. 이에따라 다중 불포화지방산인 ω-3 fatty acid 함량이 증가된 식용유의 개발을 위해서는 카놀라 식물에 대한 육종이 우선적으로 필요시된다. 그러므로 본 연구는 카놀라 식물육종을 위한 기초연구로써 카놀라의 원종인 유채를 대상으로하여 linoleic acid 를 ω-3 fatty acid인 linolenic acid 로 전환시키는 ω-3 fatty acid deasturase(FAD3)의 유전자를 도입하고자 하였다. 이를 위하여 불포화도를 증진 시키는 ω-3 desaturase 효소의 유전자(fad3)를 분리하고자 하였으며 분리된 유전자에대한 염기서열의 규명을 통하여 FAD3 효소단백질의 1차구조를 밝히고 유전자를 재조합하여 식물에 도입한후 이들내에서 재조합 *fad3* 유전자의 발현을 조사하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시 약

제한 효소, T4 DNA ligase, nick translation kit 그리고 agarose는 Bethesda research Laboratories (Gaithersburg, MD, USA)로 부터 구입하였으며, sodium dodesyl sulfate(SDS), acrylamide 그리고 bis-acrylamide는 Bio-Rad Biochemicals (Richmond, CA, USA)로 부터 구입하였다. DNA sequencing은 United states Biochemical사 (Cleveland, OH, USA)의 제품인 Sequenase 2.0 Kit를 사용하여 실시하였고, [α-^{32}P]dCTP (specific activity 3000 Ci/mmol), [α-^{35}S]dATP(specific activity 500 Ci/mmol)은 Amersham (Boston, MA, USA)으로 부터 구입하였다. Nitrocellulose filter는 Scheicher & Schuell (Keen, NH, USA)로 부터 구입하였다. 그리고 나머지 시약들도 모두 일급이상의 분석용 시약을 사용하였다.

2. 사용균주 및 프라스미드

유전자의 분리와 재조합을 위해 사용한 cloning vector및 subcloning vector로는 pGEM7(+)(Promega, Madison, USA), pUC119, pT7blue (Novagen, Madison, USA)를 사용하였다. Plant expression vector제조를 위하여 CaMV 35S dual promoter와 NOS-terminator를 이용하기 위하여 중간 vector로써 pAGUS1을 사용 하였고, 최종적인 binary vector 로는 pGA482 을 사용하였다. *Arabidopsis thaliana*의 *microsomal fad*3 cDNA 분리를 위한 DNA probe 로는 *Arabidopsis* Biological Resource Center(Columbus, USA) 로부터 분양받은 plasmid pBNDES3 를 사용하였다.

3. 지방산 불포화도 증가 효소 유전자의 분리

ω-3 fatty acid desaturase 의 유전자인 *fad*3는 *Arabidopsis thaliana*의 cDNA library로 부터 아래와 같은 plaque hybridization 방법[5]에 의하여 분리하였다.

Plaque hybridization을 위하여 *Arabidopsis thaliana* 의 seedling cDNA library로 부터 10^6정도의 phage plaque들을 $MgCl_2$가 10mM포함된 LB agar배지 위에 *E. coli* XL1- blue 과 함께 soft agar를 사용하여 도말하고 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 얻어진 plaque 들에 대하여 직경 150 mm 크기의 nitrocellulose membrane을 사용해 replica를 만든 후 이들에 부착된 DNA들을 0.5N NaOH에서 denaturation시키고, 다시 1M Tris-Cl (pH 7.0)에 의해 renaturation시켰다. 여기에 plasmid

pBNDES3 DNA를 NcoI으로 절단하여 얻어진 1.3 Kb의 *Brassica napus*로 *fad3* cDNA 조각을 random primer labeling 방법(Promega)에 의하여 ^{32}P 로 label시키고 이를 probe로 가하여 65℃에서 hybridization시켰다. Washing조건은 2×SSC buffer로 65℃에서 2번, 0.2×SSC buffer로 상온에서 1번 세척한 후 autoradiography에 의해서 positive signal 들을 보여주는 phage plaque들을 분리해 내었다. 이런 과정을 2차 3차 실시하여 positive clone들을 단일 plaque로 순수분리 하였다. 얻어진 phage cDNA clone 들에 대하여 DNA sequencing을 실시하여 이들의 유전자 서열로 부터 deduced peptide sequence를 얻고 이들을 알려진 ω-3 fatty acid desaturase의 peptide 서열과 비교한 후 일치되는 것들을 최종 선발하였다.

4. Delection mutant의 제조

DNA sequencing은 alkaline lysis 방법[6]에 의하여 분리된 plasmid DNA들을 Erase-a-Base system kit(Promega)를 사용하여 deletion mutant들을 제조한뒤 실시하였다. 이를 위하여 5㎍의 recombinant plasmid DNA를 5'-overhang 제한효소인 BamHI 과 3'-overhang 제한효소인 SacI 으로 절단하여 ethanol로 침전시킨후 다시 30㎕의 Exonuclease Ⅲ buffer (66 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 녹였다. 점진적인 deletion을 시키기 위하여 1.5㎕ (270 unit)의 Exonuclease Ⅲ를 처리하여 매 5분 마다 2.5㎕ 의 Exonuclease Ⅲ 반응액 덜어 7.5㎕의 S1 nuclease mixture (2.2 unit S1 nuclease, 0.04 M potassium acetate, pH 4.6, 0.34 M NaCl, 1.35 mM ZnSO4, 6.7 % glycerol) 와 혼합하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 각 반응액에 1㎕ 의 S1 nuclease stop buffer(0.3 M Tris base, 0.05 M EDTA) 를 첨가하여 반응을 종결시키고 70℃ 에서 10분간 반응시켜 S1 nuclease를 완전히 비활성화시켰다. 얻어진 반응액 중에서 2㎕ 씩 0.7% agarogel 전기영동을 통하여 deletion된 정도를 확인한 후 end-filling과 ligation 반응을 수행하였다. End-filling은 각 반응액에 1㎕ 의 Klenow mix (0.2 unit Klenow in 2mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, pH 8.0)를 첨가하여 37℃에서 3분간 반응시켰으며, ligation은 end-filling이 끝난 각 반응액에 40㎕ 씩의 ligation mix (0.2 unit ligase, 50mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM ATP, 5% polyethylene glycol, 1mM DTT, pH 7.6) 를 첨가하여 16℃ 에서 12시간 반응시켰다. 얻어진 DNA 들을 사용하여 E.coli DH5α를 형질전환 시킨 후 여러가지 길이의 insert를 가지는 recombinant plasmid들을 0.7% agarose gel 전기영동에 의하여 선별하고 이들을 DNA sequencing시료로 사용하였다.

5. DNA sequencing 및 단백질 서열분석

위로부터 얻어진 다양한 길이의 DNA insert들을 DNA sequencing에 사용하였다. DNA sequencing은 insert에 대해 5'과 3' 양쪽으로 동시에 진행하였으며, DNA 염기서열 분석은 Sequenase version 2.0 kit를 이용한 dideoxynucleotide chain termination 방법[7]을 사용하였다. 얻어진 DNA sequencing data는 PC/GENE software program (IntelliGenetics, CA, USA)을 사용하여 분석하고 정리하였으며 아미노산 서열도 분석하였다. 이에따른 desaturase isoenzyme 들의 단백질유사성 비교는 Internet을 통한 Genebank Database 탐색을 실시하여 비교분석하였다.

6. Polymerase chain reaction

fad3 유전자를 대장균과 식물체내에서 발현시키기 위해 제한효소 site를 도입하고 reading frame을 맞추기 위한 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. 이를 위하여 사용된 PCR primer들은 *fad3* 유전자의 부분적인 염기서열을 포함하여 제한효소 작용부위가 도입된 다음과 같은 2종류를 사용하였다.

primer1; 5'-CCCCTGGATCCGACGATGGTTGTT GCTAT-3' (BamHI, sence)

primer2; 5'-ATAGAGCTCAACAAATGGAGATT AATTG AT-3'(SacI, antisence)

PCR 표준조건은 94℃에서 2분동안 denaturation, 55℃에서 1분30초간 annealing 그리고 72℃에서 1분간 polymerasion 시키는 것을 1 cycle로 하여 25 cycles을 수행한후 최종반응으로 72℃ 에서 10 분간 더 반응시켰다.

7. 식물체 내 재조합 *fad3* 유전자도입

가. 재조합유전자의 제조

fad3 유전자를 식물에 발현시키기 위하여 먼저 pGEM7-*fad3* 재조합 plasmid를 template로 이용하여 위

에 설명된 표준 PCR[8]반응에 의한 재한효소 절단부위의 변형을 실시 하였다. 이를위해 사용한 합성올리고 primer들은 primer 1, 2번을 조합하여 사용하였다. 증폭된 DNA조각들은 pT7-blue vector(Novagen, Madision, USA)에 subcloning하여 제한효소들로 절단하고 cohesive end가 변형된 *fad*3 cDNA insert들을 다시 CaMV 35S-dual promoter와 NOS terminator을 갖고있는 casette vector인 pAGUS1에 도입하였다. 이들로 부터 다시 promoter, fad3 cDNA, NOS terminator들 순서로 연결된 유전자 조각을 분리한뒤 최종적으로 binary vector인 pGA482에 도입하였다.

나. *Agrobacterium*의 형질전환

*Agrobacterium*의 형질전환은 freeze-thaw method[9]를 이용하였다. *A.tumefaciens* LBA4404를 YEP배지(1% Bacto-pepton, 1% Bacto-yeast extract, 1% NaCl)에서 배양후 배양액 1.5ml를 원심분리하여 균체를 수거하고 200$\mu\ell$의 20mM $CaCl_2$용액에 녹인후 여기에 1μg의 DNA를 가하여 액체질소에서 5분간 급냉시키고 다시 37℃에서 다시 5분간 녹이는 방법에 의해 *A. tumefaciens*의 형질전환을 시켰다. 형질전환균주들은 streptomycin이 300μg/ml 그리고 tetracycline 이 5μg/ml 포함된 YEP agar 배지에서 30℃로 2일간 배양하였을 때 생성되는 colony들을 선발하였다.

다. Brassia napus 의 형질전환

유체의 자엽조직을 Agrobacterium vector와 cocultivation시켜[10] 캘러스 형성과정을 거치지 않고 형질전환된 개체를 얻고자 무균발아후 5일이 자란 유체의 자엽을 자병이 2mm정도 부착되게 절취하여 자병을 Agrobacterium 배양액에 수초간 침지한후 napthalene acetic acid(NAA)가 0.5mg/l 그리고 benzyl adenine(BA)가 2.0mg/l 첨가된 MS 고체배지[11]에서 72시간 배양한 다음, 생장조절제의 조성이 동일하고 100mg/l의 cefotaxime, 30mg/l의 kanamycine및 3mg/l의 $AgNO_3$가 첨가된 MS 재분화배지에 이식하고 재분화시켰다. 항생제가 첨가된 배지에서 분화된 식물체를 MS배지에 indole acetic acid(IAA)가 0.5mg/l, sucrose가 30g/l, gelrite가 2g/l 포함된 발근배지에 이식하여 계속 배양하였다.

라. Northern hybridization

식물체의 잎조직으로부터 total RNA 분리는 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction방법[12]을 따랐다. 1g의 잎조직을 액체질소에 담그어 급냉동시킨후 고운분말이 될때까지 분쇄한후 RNA extraction buffer(4M Guanidinium thiocyanate, 25mM Sodium citrate, 0.5% Sodium laurysarcosin, 0.1M β-Mecaptoethanol, pH7.0)를 10ml 가하여 식물세포를 파괴하였다. 여기에 다시 2M sodium acetate(pH4.0), Phenol(Water-saturated), chloroform/isoamylalcohol(49;1) 10ml을 넣은후 잘 썩은다음 얼음위에서 15분간 반응시켰다. 그리고 이들을 10,000xg, 4℃에서 20분간 원심분리한후 상등액을 취하여 isopropanol로 RNA들을 침전시킨후 다시 세척하고 10,000xg에서 20분간 원심분리하여 얻어진 침전을 다시 75% ethanol 세척하고 diethylpyrocarbonate(DEPC)가 처리된 증류수에 녹였다. 이와같이 추출한 total RNA를 formaldehyde 가 포함된 0.8% agarose gel 에서 전기영동을 한뒤 capillary transfer 방법으로 nytran membrane(Dupont, USA)에 옮겼다. UV crosslinker(Bilber Lourmat, USA)를 사용하여 RNA를 membrane에 고정시키고 60℃에서 prehybridization과 hybridization을 시켰다. Prehybridization과 hybridization 은 plaque hybridization 방법과 동일하게 실시하였다.

Ⅲ. 결과및 고찰

1. *fad*3 cDNA의 분리

*Arabidopsis thaliana*의 λZAP Ⅱ-cDNA library로 부터 ^{32}P로 labeling된 *Brassica napus*의 *fad*3 cDNA를 probe로 사용하여 plaque hybridization방법에 의해 전체 10^6개의 phage plaque 으로부터 약 20개의 positive clone들을 일차적으로 선별하였다. 얻어진 phage들을 2차 및 3차 plaque hybridization을 통하여 단일 phage plaque로 순수분리하여 이들로부터 다시 phage DNA를 분리하였다. 얻어진 phage DNA들중 가장 긴 길이의 cDNA insert를 갖는 것을 제한효소 *EcoRI* 으로 절단하여 agarose gel 전기영동 결과 1.8Kb와 0.8Kb의 크기를 갖는 2조각의 cDNA insert를 갖고있음을 확인하였다. *B. napus* cDNA를 probe로하여 Southern hybridization을 실시 하였을때 1.8Kb의 DNA 조각만 hybridization되고 0.8Kb의 DNA조각은 hybridization이 되지 않음을 확인할수 있었다(Fig. 1). 따라서 1.8Kb 크기의

cDNA조각을 *Arabidopsis thaliana*의 microsomal ω-3 fatty acid desaturase(FAD3)를 coding하는 *fad3* cDNA로 최종 분리정제 하였다.

2. *fad3* 유전자의 서열분석

분리된 *fad3* cDNA 의 염기서열을 확인하기 위해서 얻어진 1. 8 Kb크기의 cDNA insert를 plasmid pGEM7의 *EcoRI* 절단부위에 subcloning하여 plasmid pGEM7-*fad3* DNA를 얻었다. 이에대해 5'end 와 3'end로 부터 점진적인 deletion을 시켜 다양한 길이의 DNA insert를 갖는 DNA 들을 제조하였다. 얻어진 DNA들에 대하여 5' end 쪽과 3' end 쪽에서 부터 Sequenase kit V2.0을 이용해 DNA sequencing을 동시에 실시하였다. 이 결과 분리된 Arabidopsis 의 FAD3를 coding하는 *fad3* cDNA는 전체길이가 1,823 bp 였으며 이중 FAD3를 coding하는 open reading frame(ORF)은 1,158 bp로 구성되어 있었으며 이에 따른 FAD3단백질은 전체 386개의 amino acid로 구성되어 있고 추정 분자량은 44,075 Da임을 확인하였다(Fig. 2).

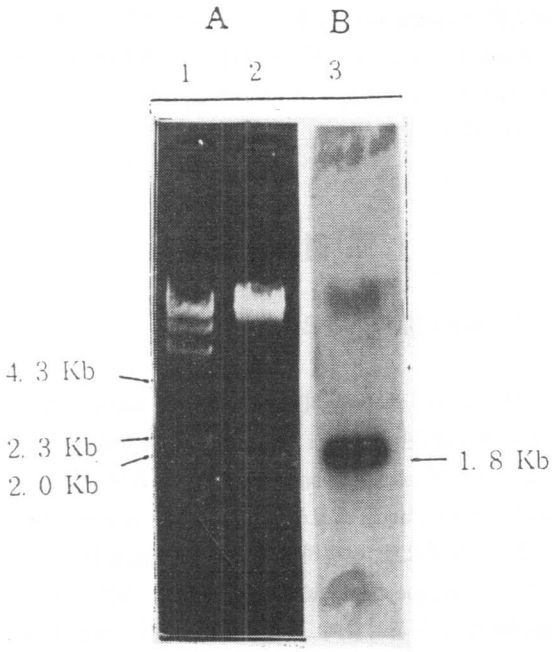

Fig. 1. Identification of *fad3* cDNA inserts in λ phage clone.

DNA isolated from a positive λphage clone was digested by *EcoRI*(A) and probed with *fad3* cDNA by Southen hybridization(B). lane 1; λ *Hind*Ⅲ size maker, lane 2; λDNA from positive clone was digested with *EcoRI*, lane 3; Sourthern hybridization of *EcoRI* cleved λDNA.

3. Isoenzyme들의 단백질 일차구조 비교

*A. thaliana*의 *fad3* cDNA 유전자 서열로 부터 얻어진 FAD3의 단백질 1차구조를 desaturase isoenzyme들인 chloroplast ω-3 fatty acid desaturase(FAD7)[13] 및 endoplasmic reticulum Δ12 fatty acid desarurase(FAD2)[14]의 구조와 비교 하였다. 이에따라 *A. thaliana*의 microsomal ω-3 fatty acid desaturase인 FAD3는 FAD7 및 FAD2와 각각 70%, 58%의 단백질 1차구조의 유사성을 보여주었으며, 이들 desaturase isoenzyme들의 구조는 공통적으로 FAD3 의 아미노산서열 82-151번째 부위와 276-333번째 부위에서 특히 높은 유사성을 보여주었다(Fig. 3). 따라서 desaturase isoenzyme들의 mide domain 과 C-terminal domain이 desaturase 효소활성에 중요한 부위인 것으로 추정된다. 이들 유사성이 높은 부위들 중 FAD3의 아미노산서열 97-108번째 부위는 Cyanobacterium의 Δ12 desaturase와도 매우높은 공통성을 보여[15] 이들 부위가 특히 desaturase의 작용에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

4. *fad3* 유전자에 의한 형질전환 식물제조

가. 재조합유전자 제조 및 *Agrobacterium*의 형질전환

*A. thaliana*의 microsomal FAD3 유전자인 *fad3*를 식물체에 도입하여 발현시키기 위한 재조합 plasmid를 재조하였다. 이를 위하여 plasmid pT7blue-*fad3* DNA를 *BamH*Ⅰ 과 *Sst*Ⅰ 으로 절단하여 1.2Kb 크기의 *fad3* DNA 조각을 분리하였다. 얻어진 *fad3* cDNA 조각을 *BamH*Ⅰ 과 *Sst*Ⅰ 으로 절단된 pAGus1 DNA에 CaMV-35S promotor 뒤에 삽입하여 재조합 plasmid pAΔ Gus1*fad3*를 얻었다. 얻어진 재조합 plasmid pAΔ Gus1*fad3* 를 다시 *EcoR*Ⅰ 과 *Sph*Ⅰ으로 절단하여 2. 7Kb 크기의 *fad3*가 포함된 DNA 조각을 binary vector인 pGA482로부터 변형시킨 pGA119의 *EcoR*Ⅰ 과 *Sph*Ⅰ 절단 부위에 삽입하여 최종적으로 plasmid p*fad3*를 얻었다(Fig. 4). 얻어진 15.9 Kb 크기의 식물 형질전환용 plasmid p*fad3*를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 freezing and thawing 방법으로 형질전환 시킨후 형질전환된 *A. tumefaciens*내의 재조합

```
                  G CGG CCG CCT CTC TCT CTC TTC TCT CTT TCT CTC CCC CTC TCT CCG GCG    -1
ATG GTT GTT GCT ATG GAC CAA CGC ACC AAT GTG AAC GGA GAT CCC GGC GCC GGA GAC CGG     60
  1  M   V   V   A   M   D   Q   R   T   N   V   N   G   D   P   G   A   G   D   R
AAG AAA GAA GAA AGG TTT GAT CCG AGT GCA CAA CCA CCG TTC AAG ATC GGA GAT ATA AGG    120
 21  K   K   E   E   R   F   D   P   S   A   Q   P   P   F   K   I   G   D   I   R
GCG GCG ATT CCT AAG CAC TGT TGG GTT AAG AGT CCT TTG AGA TCA ATG AGT TAC GTC GTC    180
 41  A   A   I   P   K   H   C   W   V   K   S   P   L   R   S   M   S   Y   V   V
AGA GAC ATT ATC GCC GTC GCG GCT TTG GCC ATC GCT GCC GTG TAT GTT GAT AGC TGG TTC    240
 61  R   D   I   I   A   V   A   A   L   A   I   A   A   V   Y   V   D   S   W   F
CTT TGG CCT CTT TAT TGG GCC GCC CAA GGA ACA CTT TTC TGG GCC ATC TTT GTT CTC GGC    300
 81  L   W   P   L   Y   W   A   A   Q   G   T   L   F   W   A   I   F   V   L   G
CAC GAC TGT GGA CAT GGG AGT TTC TCA GAC ATT CCT CTA CTG AAT AGT GTG GTT GGT CAC    360
101  H   D   C   G   H   G   S   F   S   D   I   P   L   L   N   S   V   V   G   H
ATT CTT CAT TCT TTC ATC CTC GTT CCT TAC CAT GGT TGG AGA ATA AGC CAC CGG ACA CAC    420
121  I   L   H   S   F   I   L   V   P   Y   H   G   W   R   I   S   H   R   T   H
CAC CAG AAC CAT GGC CAT GTT GAA AAC GAC GAG TCA TGG GTT CCG TTA CCA GAA AGG GTG    480
141  H   Q   N   H   G   H   V   E   N   D   E   S   W   V   P   L   P   E   R   V
TAC AAG AAA TTG CCC CAC AGT ACT CGG ATG CTC AGA TAC ACT GTC CCT CTC CCC ATG CTC    540
161  Y   K   K   L   P   H   S   T   R   M   L   R   Y   T   V   P   L   P   M   L
GCA TAT CCT CTC TAT TTG TGC TAC AGA AGT CCT GGA AAA GAA GGA TCA CAT TTT AAC CCA    600
181  A   Y   P   L   Y   L   C   Y   R   S   P   G   K   E   G   S   H   F   N   P
TAC AGT AGT TTA TTT GCT CCA AGC GAG AGA AAG CTT ATT GCA ACT TCA ACT ACT TGT TGG    660
201  Y   S   S   L   F   A   P   S   E   R   K   L   I   A   T   S   T   T   C   W
TCC ATA ATG TTC GTC AGT CTT ATC GCT CTA TCT TTC GTC TTC GGT CCA CTC GCG GTT CTT    720
221  S   I   M   F   V   S   L   I   A   L   S   F   V   F   G   P   L   A   V   L
AAA GTC TAC GGT GTA CCG TAC ATT ATC TTT GTG ATG TGG TTG GAT GCT GTC ACG TAT TTG    780
241  K   V   Y   G   V   P   Y   I   I   F   V   M   W   L   D   A   V   T   Y   L
CAT CAT CAT GGT CAC GAT GAG AAG TTG CCT TGG TAT AGA GGC AAG GAA TGG AGT TAT CTA    840
261  H   H   H   G   H   D   E   K   L   P   W   Y   R   G   K   E   W   S   Y   L
CGT GGA GGA TTA ACA ACA ATT GAT AGA GAT TAC GGA ATC TTT CTC AAC ATT CAT CAC GAC    900
281  R   G   G   L   T   T   I   D   R   D   Y   G   I   F   L   N   I   H   H   D
ATT GGA ACT CAC GTG ATC CAT CAT CTC TTC CCA CAA ATC CCT CAC TAT CAC TTG GTC GAC    960
301  I   G   T   H   V   I   H   H   L   F   P   Q   I   P   H   Y   H   L   V   D
GCC ACG AAA GCA GCT AAA CAT GTG TTG GGA AGA TAC TAC AGA GAA CCA AAG ACG TCA GGA   1020
321  A   T   K   A   A   K   H   V   L   G   R   Y   Y   R   E   P   K   T   S   G
GCA ATA CCG ATC CAC TTG GTG GAG AGT TTG GTC GCA AGT ATT AAG AAA GAT CAT TAC GTC   1080
341  A   I   P   I   H   L   V   E   S   L   V   A   S   I   K   K   D   H   Y   V
AGC GAC ACT GGT GAT ATT GTC TTC TAC GAG ACA GAT CCA GAT CTC TAC GTT TAT GCT TCT   1140
361  S   D   T   G   D   I   V   F   Y   E   T   D   P   D   L   Y   V   Y   A   S
GAC AAA TCT AAA ATC AAT TAA TCT CCA TTT GTT TAG CTC TAT TAG GAA TAA ACC AGC CCA   1200
381  D   K   S   K   I   N
CTT TTA AAA TTT TAT TTC TTG TTG TTT TTA AGT TAA AAG TGT ACT CGT GAA ACT CTT TTT   1260
TTT TTC TTT TTT TTT ATT AAT GTA TTT ACA GCA TAT TGT TGG CCG GTT CCA ATT CAC AGC   1320
GAA CGC TTA TGA GTT GTG GCA CCG TCA ACG GCA ACC TGG CAG GGT GCA TTG CCT ACT TGA   1380
CCC GAG GTG CTC CAC TTA CCC AAG GGT GCT GCA ACG GCG TTA CTA ACC TTA AAA ACA TGG   1440
CCA GTA CAA CCC CAG ACC GTC AGC AAG CTT GCC GTT GCC TTC AAT CTG CCG CTA AAG CCG   1500
TTG GTC CCG GTC TCA ACA CTG CCC GTG CAG CTG GAC TTC CTA CCG CAT GCA AAG TCA ATA   1560
TTC CTT ACA AAA TCA GCG CCA GCA CCA ACT GCA ACA CCG TGA GGT GAT GAG CGA CGG TCA   1620
AAT GAA GCT ACT AGC GGA TGT TTC GAA TAT TAT ATA ATC GAT GAG ATA ATA TTA AAT AAA   1680
GAT GTT CGA ATG GCT GTA CTC TTT TCA ATT TCC TGT CTT TTT TTA TCG TGG CGT TTC TAT   1740
TAT GTG ATC GTC TGT ACT ATG TTC GCG CGG CCG C                                    1774
```

Fig. 2. Nucleotide and deduced protein sequence of *fad*3 cDNA insert isolated from *Arabidopsis thaliana* cDNA library.

The entire nucleotide and deduced protein sequence for *fad*3 cDNA insert are shown. The positions of nucleotide numbers are indicated at right side and that of amino acid residues at left. Initiation codon, ATG and termination codon, TAA are denoted by underlines.

```
FAD3        MV-VAMDQ------------------------RTNVNG------------    13
FAD7        MANLVLSECGIRPLPRIYTTPRSNFLSNNNKFRPSLSSSSYKTSSSPLSF    50
FAD2        M-----GAGGRMPVP---TSSKKS--------------------------    16
            *      ..

FAD3        -------------------------DPGAGDRKKEERFDPSAQPPFKIGD    38
FAD7        GLNSRDGFTRNWALNVSTPLTTPIFEESPLEEDNKQRFDPGAPPPFNLAD   100
FAD2        -----------------------------ETDTTKRV-PCEKPPFSVGD    35
                                        . ....*  * . ***...*

FAD3        IRAAIPKHCWVKSPLRSMSYVVRDIIAVAALA-IAAVYVD------SWFL    81
FAD7        IRAAIPKHCWVKNPWKSLSYVVRDVAIVFALA-AGAAYLN------NWIV   143
FAD2        LKKAIPPHCFKRSIPRSFSYLISDIIIASCFYYVATNYFSLLPQPLSYLA    85
            .. *** **. ..  .*.**...*.  .  .   .. * .       ...

FAD3        WPLYWAAQGTLFWAIFVLGHDCGHGSFSDIPLLNSVVGHILHSFILVPYH   131
FAD7        WPLYWLAQGTMFWALFVLGHDCGHGSFSNDPKLNSVVGHLLHSSILVPYH   193
FAD2        WPLYWACQGCVLTGIWVIAHECGHHAFSDYQWLDDTVGLIFHSFLLVPYF   135
            *****  ** .. ...*..*.*** .**. . *...** ..** .****

FAD3        GWRISHRTHHQNHGHVENDESWVPLPERV---YKK-LPHS-TRMLRYTVP   176
FAD7        GWRISHRTHHQNHGHVENDESWHPMSEKI---YNT-LDKP-TRFFRFTLP   238
FAD2        SWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPKQKSAIKWYGKYLNNPLGRIMMLTVQ   185
            .*. *** ** * * .*.** . *  ..    * . * .. .*... *..

FAD3        LPMLAYPLYLCYRSPGKE----GSHFNPYSSLFAPSERKLIATSTTCWSI   222
FAD7        LVMLAYPFYLWARSPGKK----GSHYHPDSDLFLPKERKDVLTSTACWTA   284
FAD2        FV-LGWPLYLAFNVSGRPYDGFACHFFPNAPIYNDRERLQIYLSDAGILA   234
            .  *..*.**  . .*.     ..*. * . ..  .**  .  *..

FAD3        MFVSLIALSFVFGPLAVLKVYGVPYIIFVMWLDAVTYLHHHGHDEKLPWY   272
FAD7        MAALLVCLNFTIGPIQMLKLYGIPYWINVMWLDFVTYLHHHGHEDKLPWY   334
FAD2        VCFGLYRYAAAQGMASMICLYGVPLLIVNAFLVLITYLQHT--HPSLPHY   282
            .   *   . . *   .. .**.*  *   .*  .***.*   . .** *

FAD3        RGKEWSYLRGGLTTIDRDYGIFLNIHHDI-GTHVIHHLFPQIPHYHLVDA   321
FAD7        RGKEWSYLRGGLTTLDRDYGLINNIHHDI-GTHVIHHLFPQIPHYHLVEA   383
FAD2        DSSEWDWLRGALATVDRDYGILNKVFHNITDTHVAHHLFSTMPHYNAMEA   332
             ..**..***.*.*.*****.. .. *.* .*** **** .***. ..*

FAD3        TKAAKHVLGRYYREPKTSGAIPIHLVESLVASIKKDHYVSDTGDIVFYET   371
FAD7        TEAAKPVLGKYYREPDKSGPLPLHLLEILAKSIKKDHYVSDEGEVVYYKA   433
FAD2        TKAIKPILGDYYQ----FDGTPWYV--AMYREAKECIYVEPDRE----GD   372
            *.* *..** **.     .  * ..   .  . *.  **. . .     .

FAD3        DPDLYVYASDKSKIN   386
FAD7        DPNLY--GEVKVRAD   446
FAD2        KKGVYWYNNKL----   383
            . ..*  ..
```

Fig. 3. Homology comparison of deduced amino acid sequence from three kinds of fatty acid desaturase isoenzymes.

The protein sequence of fatty acid deasturase deduced from the cDNA sequence of *Arabidopsis* were aligned. FAD3, FAD7 and FAD2 denoted micresomal ω-3 fatty acid desaturase, chloroplast ω-3 fatty acid desaturase and delta-12 fatty acid desaturase, respectively. Identical residues are indicated by asterisks(*) and those similar are indicated by dots

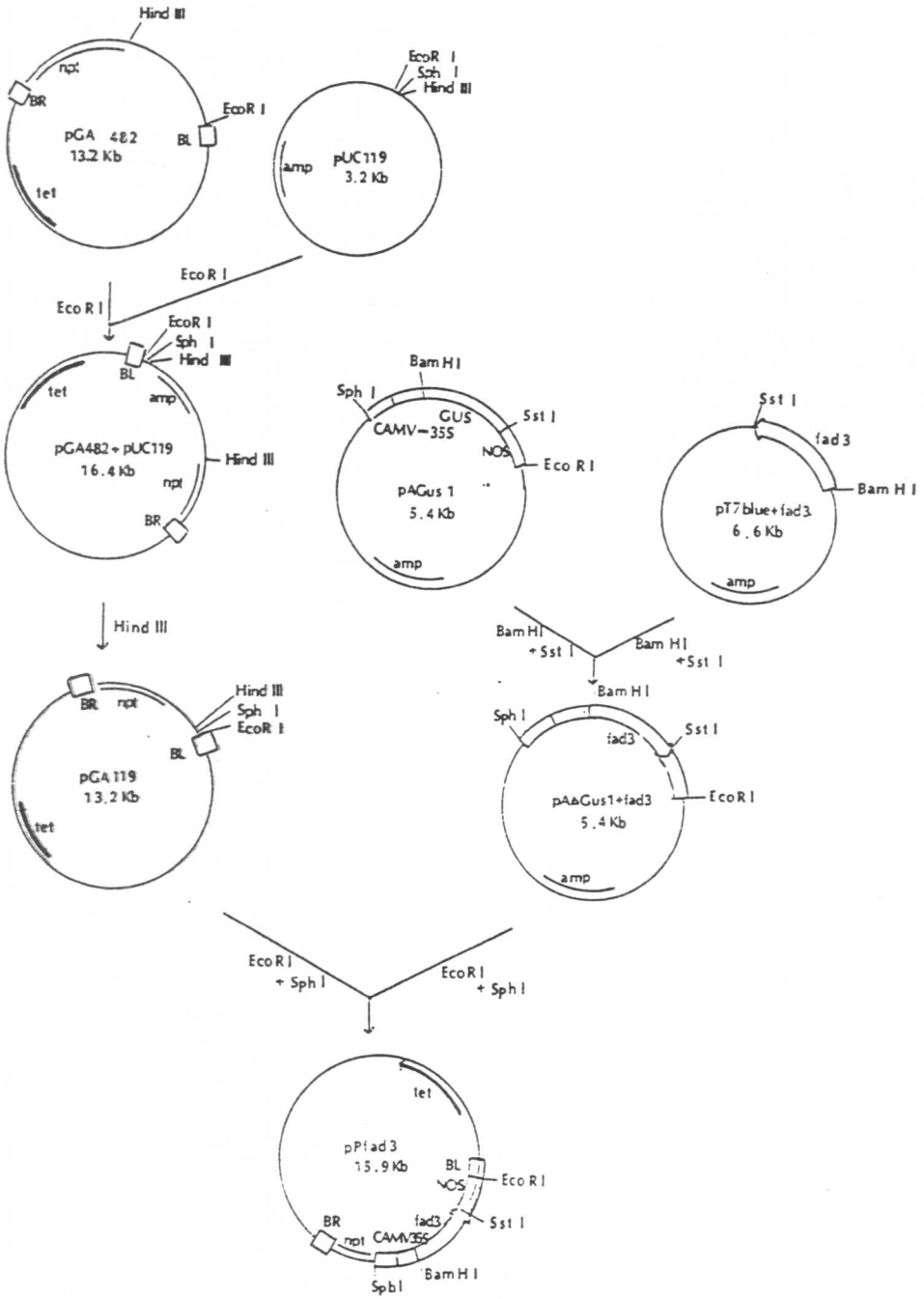

Fig. 4. Schematic diagram for the construction of the recombinant plasmid DNA(pP*fad*3).

유전자를 agarose gel 전기영동으로 재확인 하였다 (Fig. 5). *A. tumefaciens*내의 재조합 plasmid를 EcoRI으로 절단시 13.6Kb와 2.3Kb의 두개 유전자 조각이 나타남을 볼 때 형질전환 균주들은 재조합 plasmid pP*fad*3를 잘 유지하고 있음을 확인할 수 있었다.

나. 식물체내의 형질전환

유채인 *B. napus*, Hanla의 자엽조직을 형질전환 *Agrobacterium*과 cocultivation시켜 캘러스형성과정을 거치지 않고 형질전환된 개체를 얻고 자 무균발아후 5일동안 자란 유체의 자엽을 자병이 2mm정도 부착

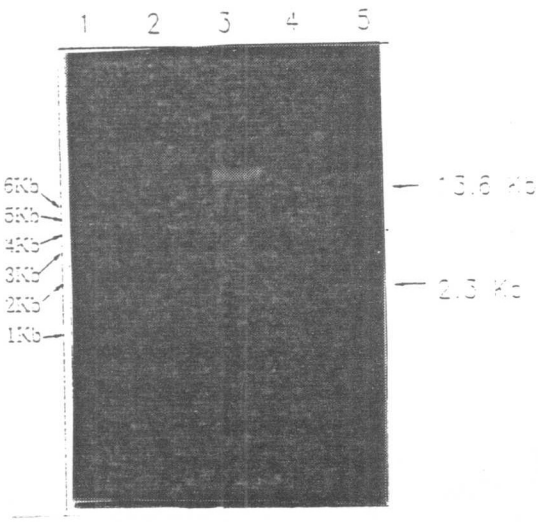

Fig. 5. Identification of the recombinant plasmid in A. tumefacience transformant.

lane 1; size maker, lane 2; intact p*Pfad3* plasmid DNA from E. coli lane 3; p*Pfad3* DNA from *E. coli* was digested with *EcoR*I, lane 4; intact p*Pfad3* plasmid DNA from A. tumefaciens LBA4404, lane 5; p*Pfad3* DNA from *A. tumefaciens* were digested with *EcoR*I.

되게 절취하여 자병을 Agrobacterium 배양액에 수초 동안 침지한후 NAA가 0.5mg/l 포함되고 BA가 2.0mg/l 첨가된 MS고체배지에 72시간 배양한 다음, 생장조절제의 조성이 cocultivation배지와 동일하고 100mg/l의 cefotaxime, 30mg/l의 kanamycine 및 3 mg/l의 $AgNO_3$가 첨가된 MS재분화배지에서 배양하여 30일동안 재분화 시켰다. 이 결과 재분화된 형질전환체를 얻을 수 있었다(Fig. 6).

다. Northern hybridization

재조합식물체의 잎조직으로부터 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법에 의해 total RNA를 분리하고 formaldehyde 가 포함된 0.8% agarose gel에서 RNA 전기영동을 한후 capillary transfer방법으로 nytran membrane에 transfer하여 60℃에서 prehybridization과 hybridization을 시켰다. 그 결과 형질전환 유채에서 1.8Kb 크기의 mRNA band가 나타남을 확인할 수 있었으며 또한 동일한 조건에서 재분화된 숙주 유체보다 유전자 발현이 더 강하게 나타남을 확인(Fig. 7) 할 수 있어 얻어진 형질전환 유채에 도입된 재조합 *fad3* 유전자가 발현되고 있음을 알 수 있었다.

Fig. 6. Transgenic B. napus regenerated on MS agar-medium.

Transgenic *B. napus* showing kanamycin resistance was grown on MS media.

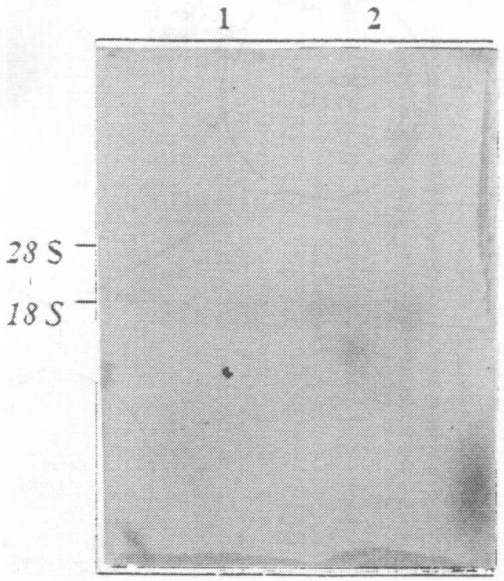

Fig. 7. Northern hybridization of *fad3* gene in transgenic *B. napus* leaf tissue.

Total RNA(20 g) isolated from 2 weeks old leaf of transgenic *B. napus* was subjected to Northern blot analysis. lane 1; nontransformant of B. napus, lane 2; transgenic *B. napus*

Ⅳ. 결 론

다가 불포화 지방산들은 세포막의 유동성과 liquide crystaline phase 유지에 영향을 주어, 식물이 냉해에 있어서 생존할수 있는 능력을 유지하게 한다고 알려져왔다. 또한 동물세포에서도 적절한 기능유지를 위해 다가불포화지방산을 함유한 phospholipid들이 필요되는데, 특히 linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid들은 동물조직에서 합성하지 못하기 때문에 필수지방산으로서 음식물을 통해서 섭취를 해야만 한다.

본 연구에서는 불포화 지방산의 일종인 linoleic acid를 linolenic acid로 전환시키는 microsomal ω-3 fatty acid desaturase(FAD3)의 유전자인 *fad3*를 *Arabidopsis taliana*의 cDNA library 로부터 *Brassica napus*의 *fad3* cDNA를 probe로 사용하여 plaque hybridization방법에 의해 분리하였다. 이결과 1.8Kb의 *Arabidopsis thaliana*의 *fad3* cDNA를 분리하였다. DNA염기서열분석결과 전체 1,823 bp의 크기를 갖는 *fad3* cDNA는 1,158bp의 완전한 open reading frame을 갖고 있었으며 그 결과 A. thaliana의 FAD3는 386개의 amino acid로 구성되어 있으며 추정분자량은 44,075 Da 임을 알 수 있었다. 또한 FAD3 단백질의 일차구조는 desaturase isoenzyme들인 delta-12 fatty acid desaturase(FAD2) 및 chloroplast ω-3 fatty acid desaturase(FAD7)의 단백질구조와 middle domain과 C-terminal 부위에서 높은 유사성을 보여주었으며 전체적으로는 각각 58%, 70%의 유사성을 보여주었다.

식물에서의 *fad3*유전자 발현을 위하여 CaMV 35S-dual promoter와 NOS-terminator를 갖는 pAGus1을 이용하여 binary vector pGA482에 *fad3* cDNA를 재조합하여 *Agrobacterium*을 이용한 유채(*B. napus. Hanla*)의 형질전환을 시도하였다. 그 결과 얻어진 유체의 형질전환 유체잎에서 *fad3* 유전자의 발현이 증가됨을 Northern blot 분석에 의해 확인 할수있었고 *B. napus*내에서는 재조합 *fad3* 유전자가 잘 발현되고 있음을 알 수 있었다. 차후 재조합식물체의 지방산 조성분석을 통하여 ω-3 fatty acid의 함량의 증가를 확인할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Goodwin, T. W. and Mercer, E. I. (1985) Introduction to Plant Biochemistry. New York, Pergamon Press.
2. Taiz, L. and Zeiger, E. (1991) Plant Physiology. Redwood City, The Benzamin/Cummings Publishing Company.
3. Wanda, H., Gombos, Z. and Murata, N. (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. Science **347**:200-203.
4. Arnold, V., Lemieux, B., Hwang, I., Gibson, S., Goodman, H. M. and Somerville, C. R. (1992) Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis. Science **258**:1353-1355.
5. Huh, T. L., Ryu, J. H, Huh, J. W., Sung, H. C., Oh, I. U., Song, B. J., and Veech, R. L. (1993) Cloning of a cDNA encoding bovine mitochondrial NADP+-specific isocitrate dehydrogenase and structural comparison with its isoenzymes from different species. Biochem. J. **292**:705-710.
6. Birnboim, H. S and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Acids Res. **7**:1513-1523
7. Sanger, F., Nicklen S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467
8. Huh, T. L., Casazza,J. P., Huh, J. W., Chi, Y. T., and Song, B. J. (1990) Characterization of two cDNA clones for pyruvate dehydrogenase E1β subunit and its regulation in tricarboxylic acid cycle-deficient fibroblast. J. Biol. Chem. **265**:13320-13326.
9. Hoslsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., Van Montagu, M., and Schell, J. (1978) Transfection and transformation of A. tumefaciens. Mol. Gen. Genet. **163**:181-187.
10. Son, C. K and Cho, H. S. (1991) Transformation of Brassica nupus by cocultivation with A. tumefaciens. Kor. Plant Tiss. Cult. **18**:113-118.
11. S. B. Gelvin., R. A. Schilperoort., and D. P. S. Verma. (1988) Plant Moleculer Biology, Norwell, Kluwer Academic Publishers.
12. Shomzynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method RNA I solation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloform extraction. Analytical Biochemistry **162**:156-159
13. K, Iba., S, Gibson. T, Nishiuchi., T, Fuse., M,

Nishimura., V, Arondel., S, Hugly., and C, Somerville. (1993) A Gene Encoding a Chloroplast ω-3 Fatty Acid Desaturase and Chloroplast Copy Number of the fad7 Mutant of Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem. **268**:24099-24105.

14. K, Iba., S,Gibson. T, Nishiuchi., T, Fuse., M, Nishimura., V, Arondel.,S,Hugly., and C, Somerville. (1993) A Gene Encoding a Chloroplast ω-3 Fatty Acid Desaturase and Chloroplast Copy Number of the fad7 Mutant of Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem. **268**:24099-24105.
15. J, Ojuley,. J, Lightner,. K, Feldmann,. N, Yadav,. E, Lark,. and J, Browse. (1994) Arabidopsis FAD2 Gene Encodes the Enzyme That Is Essential for Polyunsaturated Lipid Synthesis. The Plant Cell. **6**:147-158
16. Wanda, H., Gombos, Z., and Murata, N. (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation