

*Arabidopsis thaliana*로부터 지방산 불포화효소 유전자의 분석

박희성* · 임경준¹

대구효성가톨릭대학교 식물육종학과, ¹경북대학교 유전공학과

Characterization of a *fad3* cDNA Encoding Microsomal Fatty Acid Desaturase from *Arabidopsis thaliana*.

PARK, Hee Sung* · LIM, Kyung Joon¹

Department of Plant Breeding, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungbuk, 713-702, Korea: and

¹Department of Genetic Engineering, Kyungbuk National University, Taegu, 702-701, Korea. *Corresponding author.

For the molecular genetic study of cold tolerance mechanism in plants, a cDNA encoding fatty acid desaturase (*fad3*), converting linoleic acid (18:2, ω -6) to linolenic acid (18:3, ω -3), was isolated from λ ZAPII *Arabidopsis thaliana* cDNA expression library by plaque hybridization using *fad3* cDNA probe derived from *Brassica napus*. A 1.8 kb-*EcoRI* fragment from a lambda clone showing a strong positive hybridization signal was subcloned into pGEM7 and analyzed for its nucleotide sequence. From deduced amino acid sequences, the *fad3* gene was revealed to have an open reading frame (ORF) consisting of 386 amino acids with a molecular mass of 44,075 Da. The *fad3* gene was compared to chloroplast ω -3 fatty acid desaturase (*fad7*) and endoplasmic reticulum Δ 12 fatty acid desaturase (*fad2*) to show 70% and 58% amino acid sequence homology, respectively. Especially, amino acids of internal (82 to 151) and carboxy terminal (276 to 333) regions were highly conserved, implying their requisite role for enzymatic functioning of fatty acid desaturases. IPTG-induced *fad3* cDNA expression in *E. coli* cells was suggested to be toxic to bacterial growth.

Key words: fatty acid desaturase, *fad3* nucleotide sequence, sequence homology

식물膜的 지방산조성 중 불포화지방산은 식물의 내냉성과 밀접한 연관을 지니고 있으며 다가불포화지방산의 비율이 상대적으로 낮은 식물의 경우 냉온감수성의 경향을 지니는 것으로 알려져 있다(Chen and Li, 1980; Fowler et al., 1977). 膜의 구조는 fluid mosaic model(Singer and Nicolson, 1972)을 기준으로 냉온감수성식물이 저온상태에 지속적으로 노출될 경우, 膜구조는 겔상으로의 전이가 용이하게 일어나며 이에 따라 막기능의 저하가 나타나는 것으로 알려져 있다. 이에 비해 내냉성식물의 경우, 겔상으로의 전이가 훨씬 억제되는 것으로 알려져 있는데 이는 膜지질의 불포화지방산/포화지방산 비율이 내냉성의 경우 상대적으로 높기 때문인 것으로 알려지고 있다(Steponkus, 1983; Uemura and Yoshida, 1984; Yoshida, 1984). 지방산은 cytosol이나 plastid에서 생합성되며 포화지방산으로부터 oleic acid(OA, 18:1, ω -9), linoleic acid(LA, 18:2, ω -6), linolenic acid(LnA,

18:3, ω -3)등의 주요 불포화지방산으로의 전환은 불포화효소계에 의해 이루어진다. 불포화지방산 함량이 내냉성에 미치는 영향에 대한 분자유전학적 이해를 위한 연구가 보고되고 있으며 가령, Δ 12 불포화효소유전자를 냉온 감수성의 *Anacystis nidulans*에 도입할 경우 LA함량을 증가시키고 저온조건에서도 정상생육온도에서와 거의 유사한 광합성활동이 유지된다는 보고는 불포화지방산함량과 내냉성과의 밀접한 유전적 관련성을 시사하고 있다(Wanda et al., 1990). 식물의 경우에 있어서도 *Arabidopsis thaliana*로부터의 엽록체 ω -3 지방산 불포화효소 유전자(*fad7*)의 내냉성에 대한 분자유전적 관련성이 보고된 바 있다(Iba et al., 1993). 따라서 식물의 주요 불포화지방산 합성에 관련된 효소계에 대한 유전자의 이해는 내냉성기작을 해명하기 위한 분자유전적 연구대상으로서 그 가치가 높다. 본 연구는 식물의 내냉성기작에 대한 불포화지방산의 유전적연구를 위해 A.

thaliana cDNA library로부터 지방산 불포화 효소(ω -3 desaturase) 유전자인 *fad3* cDNA를 분리해내고 이들의 유전자서열 및 단백질서열을 기타 불포화지방산 효소의 유전자와 비교규명하였다. 또한 재조합 *fad3* 유전자의 대장균에서의 발현을 시도하였다.

재료 및 방법

Plaque hybridization에 의한 유전자의 분리

*A. thaliana*의 microsomal *fad3* cDNA 분리를 위한 DNA probe로는 Arabidopsis Biological Resource Center(Columbus, USA)로부터 분양받은 *Brassica napus*로부터의 *fad3* 유전자(pBNDES3)를 사용하였다. pBNDES3 DNA를 *Nco*I으로 절단하여 얻어진 1.3 kb의 cDNA 조각은 random primer labeling 방법(Promega)에 의하여 [α - 32 P]dCTP로 표식하였다. ω -3 fatty acid desaturase의 유전자 선발은 *A. thaliana*의 cDNA library로부터 plaque hybridization 방법(Sambrook et al., 1989)에 의하여 행하였다. 2차, 3차 hybridization의 선발에 의해 *A. thaliana*의 *fad3* lambda clone을 순수분리 하였다.

Deletion mutant의 제조 및 염기서열 분석

A. thaliana *fad3* lambda clone으로부터의 1.8 kb cDNA insert는 subcloning을 위하여 pGEM7의 *Eco*RI 위치에 삽입하였으며 이는 *E. coli* DH5 α 에 도입하여 pGEM7-*fad3*을 선발하였다. *fad3* cDNA의 deletion mutant의 제조를 위해 Erase-a-Base system(Promega)을 사용하였다. 재조합 plasmid DNA는 5'-overhang 제한효소인 *Bam*HI과 3'-overhang 제한효소인 *Sac*I으로 절단하고 점진적인 deletion을 위해 5분 간격으로 Exonuclease III 반응액을 취해 S1 nuclease mixture(2.2 unit S1 nuclease, 0.04 M potassium acetate, pH 4.6, 0.34 M NaCl, 1.35 mM ZnSO $_4$, 6.7% glycerol)와 혼합하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 0.7% agarose gel 전기영동을 통하여 deletion된 정도를 확인한 후 end-filling과 ligation 반응을 수행하였다(Promega manual 참조). 얻어진 DNA는 *E. coli* DH5 α 에 형질전환 시킨 후 여러 길이의 insert를 가지는 recombinant plasmid들을 0.7% agarose gel 전기영동에 의하여 선별하였다. DNA sequencing은 deleted insert에 대해 5'과 3' 양쪽으로 동시에 진행하였으며 dideoxynucleotide chain termination 방법(Sanger et al., 1977)을 사용하였다. DNA 및 아미노산서열분석을 위해 PC/GENE software program(IntelliGenetics, CA, USA)을 이용하였다. 불포화지방산효소의 isoenzyme들과의 유사성 비교는 Internet을 통한 Genebank Database에 의존하였다.

Polymerase chain reaction

A. thaliana *fad3* 유전자의 대장균내 발현을 위해 제한효소 site 및 reading frame이 고려된 합성 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다(Primer 1, 5'-TCTCCGCATATGGTTGTGCTATGGCACAA-3' : Primer 2, 5'-TTCCTACTCGACTAAACAAATGGAGATTA-3'). PCR 표준조건은 94°C에서 2분 동안 denaturation, 55°C에서 1분 30초간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 polymerization 시키는 것을 1 cycle로 하여 25 cycles을 수행한 후 최종반응으로 72°C에서 10 분간 더 반응시켰으며 Gene-clean 방법에 의해(Bio101, USA) PCR산물을 분리한 후, 이는 agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

대장균에서 재조합유전자의 발현

대장균내에서의 *fad3* cDNA의 발현과 단백질 분리를 위하여 plasmid vector pET-14b(Novagen, USA)를 사용하였다. 재조합단백질의 N-terminal에 His-tag sequence가 포함되도록 하는 plasmid pET-14b에 PCR수행에 의한 *fad3* cDNA를 재조합하여 Calcium Chloride방법에 의해 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하고 재조합 단백질의 생성을 시도한 후 SDS polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 확인하였다(Sambrook et al., 1989).

결 과

*A. thaliana*로부터 *fad3* cDNA의 분리 및 구조분석

*A. thaliana*의 λ ZAP II -cDNA expression library로부터 *B. napus*의 *fad3* cDNA를 probe로 사용하여 plaque hybridization방법에 의해 10⁶개의 phage plaque을 우선 1차적으로 선발하였다. 그 결과 강한 positive signal이 보이는 약 20개의 positive clone들이 선별되었다. 이들 예비 recombinant lambda clone들은 2차 및 3차의 연속적인 plaque hybridization을 실시하여 순수한 λ clone들을 최종적으로 선발하였다. 이들로부터 λ DNA를 분리하여 insert DNA의 크기를 확인하고 상대적으로 가장 긴 크기의 insert를 지닌 recombinant λ clone(λ AT*fad3*)을 선택하여 염기서열 결정대상으로 정하였다. λ AT*fad3*로부터의 DNA를 분리하여 *Eco*RI 제한효소로 절단하였으며 그 결과 1.8 Kb와 0.8 Kb의 DNA가 생성됨이 확인되었다. 이들 DNA조각은 *B. napus*의 *fad3* cDNA를 probe로 사용한 Southern hybridization으로 확인하였으며 이 때, 1.8 Kb의 DNA만이 강하게 hybridization됨이 확인되었다(결과 미발표). 1.8 Kb의 DNA insert는 subcloning을 위하여 pGEM7의 *Eco*RI 절

ATG GTT GGT GCT GTC TCT GTC TTC TCT CTT TGT CTG CCC GTC TGT CCG GGT
 1 120
 AAG AAA GAA GGA AGG TTT GAT GCG AAG GCA GAA GCG GTC AAG ATC GAA GAT ARA AAG
 21 120
 Y Z Z Z P R A A Q P P K I Q D I R
 GCG GCG ACT GCT AAG CAC TGC TGG GTT AAG APT GGT TTA AGA TCA ATC ACT TAC UTC CTC
 43 180
 A A I I D R B C W V X B P C S W M S V V V
 AAT GAG ATT ATC GGC GTC GGG GGT TTC GGC ACC ATC GCG GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC
 61 240
 Y C T TGG GCT CTT TAT TGG GGC GCA GCA GCA CTA GTC TTC TGG GGC ATC TTT GTC TGT
 81 300
 CAC GAC TGC GGA CAT GAG APT TTC TCA GAC ATT GGT GTA TGG AAT APT APT APT APT APT
 101 360
 ATT CTT CAC TGT TGC ATC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC
 121 420
 I L N B F I W D Y B O W R K I S B R T H
 AAC GAG AAC GAG GGC GAG GGT GAA AAG GAC GAG TCA TGG GTC GCG TTA GCG GAA AAG GTC
 141 480
 TAC AAG AAA TTA CCG CAC AAT AAT GCA AAG GCA AAG GCA AAG GCA AAG GCA AAG GCA
 161 540
 Y R X L F M S T R H G K X T V D L I Y L
 GCA TAT GTC TAT TTT TCG TGC AAG APT GTC TGA AAA GAA GCA TCA CAT TTT AAG GCA
 181 600
 A F P L F L C E R S P B R F N E M F Y Z
 TAC AAG AAA TTA CCG CAC AAT AAT GCA AAG GCA AAG GCA AAG GCA AAG GCA AAG GCA
 201 660
 Y B S L Y A P S R R R K I T A T T G A C T T A A T A T T A A T A T T A A T A T T A A
 221 720
 TCC ATA ATG TTC GTC AAT CTT ATC GCT GCA TTT GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC
 241 780
 AAA GTC TAC GAT GCA GCG GCG TGT GAT AAT GTC TTT GTC AAT GTC TTT GTC AAT GTC TTT
 261 840
 CAT CAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 281 900
 B B H
 301 960
 CTT GCA GCA TTA ACA GCA AAT GAT GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA
 321 1020
 GCA ATA GCG ATC CAC TTT GTC GAG AAT TTT GTC GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCA
 341 1080
 A L V L K L V Z S I Y A B C G T R B N M Y V
 AAG GAG AAT GAG GAT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
 361 1140
 S D H O D L Y V Y
 GAC AAA CTT AAA ATG AAT TTA TGT GCA TTT GAT TAT GTC TAT TAT GAA TAA AAC AAT CCA
 381 1200
 D K E X I R
 CTT TTA AAA TTT TAT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
 1220 1280
 TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
 1300 1360
 GCG GAG GTT GTC GAC TTA GTC AAG GGT GGT GCA ACC GCG TTA GCA ACC TTA AAA ACA TGG
 1440 1500
 GCA GTA GAA GCG GAT ACC GTC AAG AAG TTT GCG TTT GCG TTT AAT CTA GCG GTA AAS GCG
 1520 1580
 TTT GTC CCG GTC TCA TCA GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC
 1620 1680
 TTT CTT ACA AAA TGA GCG GCA GCA ACC GCA ACC GCA ACC GCA ACC GCA ACC GCA ACC GCA
 1740 1800
 AAC GAA CTT AAT AAG TAT TTT GAA TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT
 1820 1880
 GAT CTT CAA ATG GCT GCA CTT TTT TCA ATC TCC TTT CTT TTT TTA TTT TTT TTT TTT TTT
 1940 2000
 TAT CTT ACC GTC TAT ACT ATG TTC GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG

Figure 1. Nucleotide and deduced protein sequence of *A. thaliana* *fad3* cDNA. Initiation codon, ATG and termination codon, TAA are underlined.

단부위에 도입하였다. 이에 의하여 pGEM7-ATfad3를 얻었
 으며 이에 대한 전체적인 염기서열을 결정하기 위해 우선
 5'과 3'의 끝으로부터 ExoIII에 의해 점진적으로 제거된 다
 양한 길이의 ATfad3DNA insert를 갖는 DNA들을 제조하였
 다. 이들 deleted mutant의 DNA 각각에 대한 염기서열분석
 과 이들의 서열조합에 의해 Figure 1과 같은 *A. thaliana*
fad3 유전자의 완전한 염기서열이 결정되었다. *A. thaliana*의
fad3 cDNA 유전자 서열을 이용하여 아미노산서열로 전환
 시킨 후 FAD3의 단백질 1차구조를 결정하였다. 이는 지방산
 불포화효소의 isoenzyme들인 chloroplast ω-3 fatty acid
 desaturase(FAD7) (Iba et al., 1993) 및 endoplasmic reticulum
 Δ-12 fatty acid desaturase (FAD2)(Ojuley et al., 1994)의 구
 조와 비교 하였으며 그 결과는 Figure 2에 보이고 있다.

재조합 FAD3 단백질의 생성

대장균내의 FAD3 단백질생성은 재조합단백질의 N-
 terminal에 His-tag sequence를 갖도록하는 pET-14b plasmid
 vector를 사용하였으며 숙주로서 *E. coli* BL21(DE3)를 이용
 하였다. NdeI과 XhoI 제한효소 절단부위가 각각 포함되어
 있는 primer1과 2를 이용한 PCR을 시행하여 *fad3* cDNA의
 증폭을 실시하였고 증폭된 1.2 Kb 크기의 PCR 생성물은
 일단 pT7blue에 도입한 후(pT7blue-ATfad3) 이를 NdeI과
 XhoI으로 절단한 DNA 절편을 pET14b에 도입하여 최종적
 으로 pET-ATfad3를 얻었다(Figure 3). 단백질의 생성을 위

FAD3	MV-VAMDQ-----RTNVNG-----	13
FAD7	MANLVSECGIRPLRPIYTPRPNFLSNNNKFRPLSSSSSYKTSPLSF	50
FAD2	M-----GAGGRMPVP-----TSSKKS-----	16
	*	
FAD3	-----DPGAGDRKKEERFDPSAQPPFKIGD	38
FAD7	GLNSRDGFTRNWLNVSTPLTTPIFEESPLEEDNKQRFDPGAPPENLAD	100
FAD2	-----ETDTTKRV-PCEKPFVSVD	35
	*	
FAD3	IRAAIPKHCWVKSPLRSMYSVVRDIIAVALA-IAAAYV-----SWFL	81
FAD7	IRAAIPKHCWVKNPWKSLSYVVRDVAIVFALA-AGAAAYLN-----NWIV	143
FAD2	LKKAIPHCFKRIPRSFYSYLSDIIIASCFYVAIYFLLPQLSLSYLA	85
	*	
FAD3	WPLYWAAQGLFWAI FVLGHDCGHGFSFDIPLLMSVVGHI LHSFILVYPYH	131
FAD7	WPLYWLAQGTMEWAL FVLGHDCGHGFSNDPKLMSVVGHLHLSIILVYPYH	193
FAD2	WPLYWACQGCVLGTGIWIAHECGHAFSDYQWLDVTGLIFHFSFLVYPYF	135
	*	
FAD3	GWIRISHRTHQHNGHVENDESIVLPERV---YKK-LPHS-TRMLRYTVP	176
FAD7	GWIRISHRTHQHNGHVENDESHPMSEKI---YNT-LDKP-TRFFRFTLP	238
FAD2	SWKYSHRHHSNTGSLERDEVFVPKQKSAIKWYKYLNNPLGRIMMLTVQ	185
	*	
FAD3	LPMLAYPLYLCYRSPGK---GSHFNYSYSLFAPSERKLIATSTTCWSI	222
FAD7	LVMLAYPFYLWARSFGK---GSHYFPDSDLPLPKERKDLTSTACWTA	284
FAD2	FV-LGWPLYLAFNVSGRYPDGAFCHFFPNAPIYNDRELRQLYSLDAGILA	234
	*	
FAD3	MFVSLIALSFVFGPLAVLKVYGVPIIIFVMWLDAVTYLHHHGHDKLPWY	272
FAD7	MAALLVCLNFTIGPIQMLKLYGIPYWINVMWLDVFTYLHHHGHDKLPWY	334
FAD2	VCFGLRYAAAQGMASMI CLYGVGLVNLVNAFLVIITYLQHT---HPSLPHY	282
	*	
FAD3	RGKWSYLRGGLTTIDRDYGI FLNIIHDDI-GTHVIHHLFPQIPHYHLVDA	321
FAD7	RGKWSYLRGGLTTLDRDYGLINIIHDDI-GTHVIHHLFPQIPHYHLVDA	383
FAD2	DSSEWDWLRGALATVDRDYGI LNKVFNITDTHVAHHLFSTMPHYNAMEA	332
	*	
FAD3	TKAAKHVLGRYYREPKTSGAIPIHLVLSLVASIKKDHYSVTGDIVFYET	371
FAD7	TEAAKPVLGKYYREPDKSGPLPLHLLEILAKSIKKDHYSVDEGEVYVYKA	433
FAD2	TKAIKPLGDYQ---FDGTFWYV---AMYREAKEIYVEPDRE---GD	372
	*	
FAD3	DPDLVYASDKSKIN	386
FAD7	DPNLV--GEVKVRAD	446
FAD2	KKGVYWNKLN---	383
	*	

Figure 2. Homology comparison of deduced amino acid sequences of fatty acid desaturases from *A. thaliana*: FAD3, microsomal ω-3 desaturase; FAD7, chloroplast ω-3 desaturase; FAD2, Δ-12 desaturase. Asterisks indicate identical residues and dots are ones with similarity.

하여 pET-ATfad3를 지니고 있는 *E. coli* BL21(DE3)를 배
 양하였다. LBamp배지에서 배양시 OD550=0.8이 될 때
 IPTG를 0.4 mM이 되게 첨가한 후, 4시간 계속 더 배양하
 고 이로부터 단백질생성의 변화는 SDS/PAGE에 의해 조사
 하였다. 그 결과는 Figure 4A에 나타나고 있다. 한편 IPTG
 에 의한 단백질유도생산이 숙주인 *E. coli* BL21(DE3)의 생
 육에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 비형질전환숙주와
 IPTG처리유무에 의한 생육의 변화를 OD관찰에 의해 측정
 하였다. OD550에서 OD가 0.8이 될때까지 배양하고 이에 대
 해 IPTG(0.4 mM)처리 및 무처리를 통하여 그 결과를 관찰
 하였으며 이 때, 동일한 조건에서 *E. coli* BL21(DE3)나
 pET14b만이 도입된 균주도 IPTG의 유무처리의 상태로 배
 양하였다. 그 결과는 Figure 4B에 나타나고 있다.

고 찰

본 연구는 식물의 불포화지방산의 합성과 이에 의한 내생

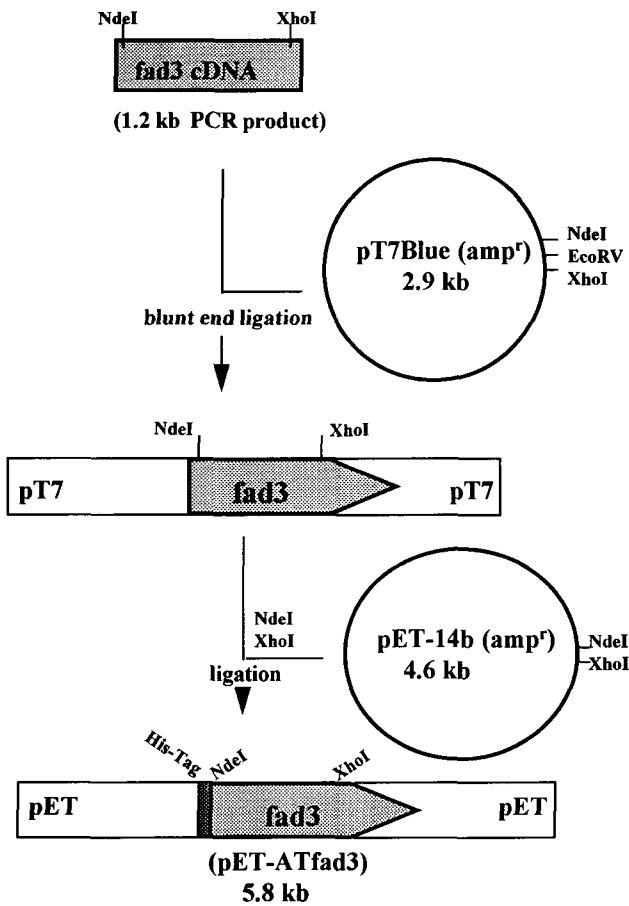


Figure 3. Schematic diagram for the construction of recombinant plasmid pET-ATfad3

성기작의 분자유전학적 연관성을 입증하기 위한 관련유전자의 분리 및 구조규명을 위한 것으로서 특히 2가 불포화의 linoleic acid를 3가 불포화인 linolenic acid로 전환시키는 지방산불포화효소의 유전자(*fad3*)를 개화식물인 *A. thaliana*의 cDNA expression library로부터 plaque hybridization 및 DNA sequencing방법을 사용해 분리하였다. 현재까지 이에 관련된 유전자분리 및 특징연구는 *A. thaliana*의 경우 microsomal ω -3 지방산불포화효소의 genomic DNA (Nishiuchi et al., 1994)나 chloroplast ω -3 지방산불포화효소의 cDNA (*fad7*) (Gibson et al., 1994), *Nicotiana tabacum* cv. SR1로부터의 *fad7* 유전자(Hamada et al., 1994), *Glycine soja*의 *fad3* 유전자(Yadav et al., 1993), *Brassica napus*의 *fad3* 유전자(Arondel et al., 1992) 등이 있다. 본 연구에서 분리한 *A. thaliana*의 *fad3* cDNA는 전체길이가 1,823 bp로 밝혀졌으며 이 중 coding region으로서의 open reading frame (ORF)은 1,158 bp로 구성된 것으로 판단되고 있다. 이에 따라 FAD3 효소는 전체 386개의 amino acid로 구성되어 있고 분자량은 44,075 Da으로 추정되고 있다. *A. thaliana*의 microsomal ω -3 fatty acid desaturase인 FAD3를 chloroplast FAD7 및

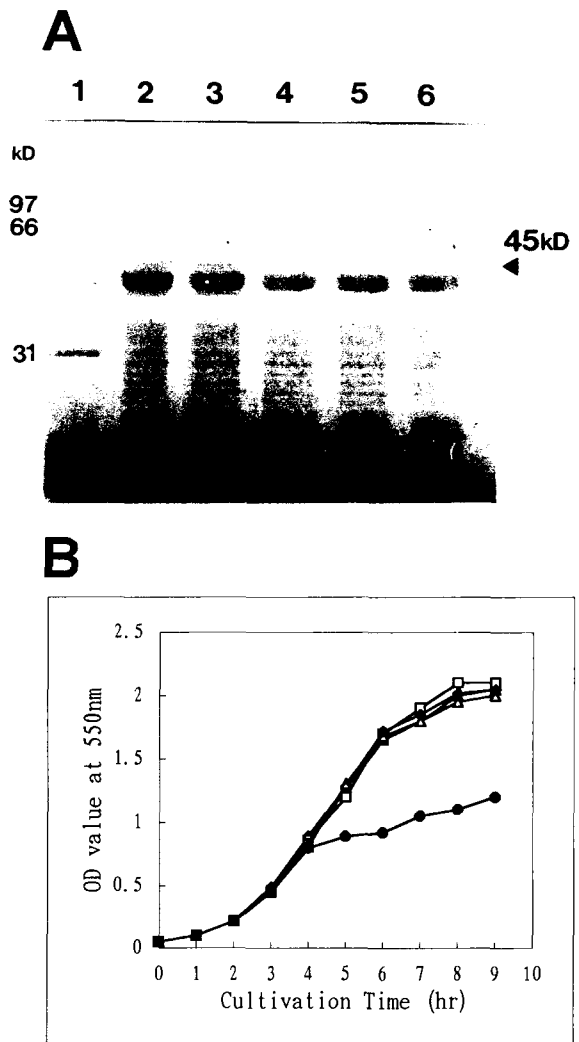


Figure 4. FAD3 protein synthesis in *E. coli*.

(A) FAD3 protein synthesis upon IPTG induction analysed by SDS/PAGE. lane 1, protein size marker; lane 2, proteins from *E. coli* BL21; lane 3, from *E. coli* harboring pET14b; lane 4, from IPTG-induced *E. coli* pET14b; lane 5, from *E. coli* pET-ATfad3; lane 6, from IPTG-induced *E. coli* pET-ATfad3. (B) Growth profile of *E. coli* harboring pET-ATfad3 upon IPTG induction. □, *E. coli* BL21 with IPTG; ◇, *E. coli* BL21 harboring pET14b without IPTG; △ *E. coli* pET14b with IPTG; ▲, *E. coli* pET-ATfad3 without IPTG; ●, *E. coli* pET-ATfad3 with IPTG.

endoplasmic FAD2(Ojuley et al., 1994)와 단백질의 일차구조를 비교할 때, 각각 70%와 58%의 유사성을 보이고 있다. 이들 desaturase isoenzyme들의 구조는 공통적으로 FAD3의 아미노산서열 82-151번째 부위와 276-333번째 부위에서 특히 높은 유사성을 보여주고 있으며 따라서 desaturase isoenzyme들의 middle domain과 C-terminal domain은 desaturase 효소활성에 중요한 부위인 것으로 추정된다. 이들 유사성이 높은 부위들중 FAD3의 아미노산서열 97-108번째 부위는 Cyanobacterium의 Δ 12 desaturase와도 매우 높은

공통성을 보여(Wanda et al., 1990) 이들 부위가 특히 desaturase의 작용에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 한편, 본 연구에서 분리한 *fad3* cDNA의 대장균내 발현을 통한 FAD3단백질생성의 시도에서는 IPTG처리에 의한 유도생성이 관찰되지 않았다. 이 경우 plasmid의 분리 후 제한효소절단 및 염기서열의 확인에 의해 재조합 plasmid의 대장균내에서 그 안정성이 유지됨을 확인하였다(결과 미발표). 따라서 대장균내에서 재조합 FAD3 단백질의 생성이 되지 않음은 재조합 FAD3 단백질이 숙주 세포에 대한 유해 가능성이 있다고 보여짐으로써 *fad3* 재조합 plasmid를 지닌 숙주와 비형질전환숙주에 대한 IPTG의 처리/무처리에 대한 성장곡선을 관찰하였다. 그 결과 숙주인 *E. coli* BL21(DE3)와 plasmid vector만이 도입된 경우, IPTG처리 후에도 정상적인 세포분열이 계속 일어나는 반면 형질전환된 세포의 경우 그렇지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 재조합된 FAD3 단백질의 숙주생육에 대한 유해성을 시사하고 있다. 재조합 FAD3 단백질이 생성되지 않는 다른 가능성으로서는 식물의 *fad3* cDNA의 codon사용이 미생물의 codon사용과 상이성을 나타내기 때문으로도 해석할 수 있다. 가령 *fad3* 유전자에서는 glycine codon이 GGA가 13개, GGPy이 9개, GGG가 1개이고 arginine codon은 AGPu이 8개, CGPy이 1개, CGPy가 2개이며 leucine codon이 CUpy이 14개, UUPu이 13개, CUG가 1개, CUA가 3개으로써 이들은 일반적으로 대장균에서는 매우 빈도가 낮은 codon들로 알려져 있다.

적 요

Linoleic acid를 linolenic acid로 전환시키는 지방산불포화효소의 유전자(*fad3*)를 유체의 *fad3* DNA probe를 이용한 plaque hybridization방법으로 λ ZAPII *Arabidopsis thaliana* cDNA expression library로부터 분리하였으며 1.8 kb-*EcoRI* DNA조각을 지니는 lambda clone을 pGEM7으로 subcloning하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과로부터의 아미노산서열분석에 의하면 *fad3* 유전자는 open reading frame이 386개의 아미노산으로 이루어졌으며 44,075 Da의 분자량이 예측되고 있다. 엽록체의 ω -3 지방산불포화효소(*fad7*)와 endoplasmic reticulum의 지방산불포화효소(*fad2*)와의 비교시 각각 70%와 58%의 유사성이 나타났다. 특히 82-151의 아미노산서열과 276-333의 아미노산지역은 보존성이 높았으며 이는 불포화지방산효소의 기능에 필수적인 지역으로 보여진다. 한편 대장균을 이용한 IPTG에 의한 Fad3단백질의 유도생성은 대장균의 생육에 독성효과를 나타내는 것으로 나타났다.

시사-본 연구는 1996년도 대구효성가톨릭대학교 연구비 지원에 의한 것입니다.

인 용 문 헌

- Arondel V, Lemieux B, Hwang I, Gibson S, Goodman HM, Somerville CR (1992) Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science* 258: 1353-1355
- Chen HH, Li PH (1980) Biochemical changes in tuber-bearing Solanum species in relation to frost hardiness during cold acclimation. *Plant Physiol.* 66: 414-419
- Fowler DB, Dvorak J, Gusta LV (1977) Comparative hardiness of several Triticum species and *Secale cereale* L. *Crop Sci.* 17: 941-943
- Gibson S, Arondel V, Iba K, Somerville C (1994) Cloning of a temperature regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106: 1615-1621
- Hamada T, Kodama H, Nishimura M, Iba K (1994) Cloning of tobacco cDNA encoding omega-3 fatty acid desaturase. *Gene* 147: 293-294
- Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, Fuse T, Nishimura M, Arondel V, Hugly S, Somerville C (1993) A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 268: 24099-24105
- Nishiuchi T, Nishimura M, Arondel V, Iba K (1994) Genomic nucleotide sequence of a gene encoding a microsomal omega-3 fatty acid desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105: 767-768
- Ojuley J, Lightner J, Feldmann K, Yadav N, Lark E, Browse J (1994) *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *The Plant Cell* 6: 147-158
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) In *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of membrane. *Science* 175: 720-731
- Steponkus PL (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 543-584.
- Uemura M, Yoshida S (1984) Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings. *Plant Physiol.* 75: 818-826
- Wanda H, Gombos Z, Murata N (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* 347: 200-203
- Yadav N, Wierzbicki A, Aegerter M, Caster C, Perez-Grou L, Kinney A, Hitz W, Booth J, Schweiger B, Stecca K (1993) Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. *Plant Physiol.* 103: 467-476
- Yoshida S (1984) Studies on freezing injury of plant cells. Relation between thermotropic properties of isolated plasma membrane vesicles and freezing injury. *Plant Physiol.* 75: 38-42

(1997년 2월 23일 접수)