

식물의 산업용 지방산 생산을 위한 오일합성 유전자의 기능과 이용 전망

김현욱 · 이경렬 · 박종석 · 노경희 · 김순희 · 김종범

Acyltransferases for production of industrial oils in transgenic plants

Hyun Uk Kim · Kyeong-Ryeol Lee · Jong-Sug Park · Kyung Hee Roh · Sun Hee Kim · Jong Bum Kim

Received: 4 May 2010 / Accepted: 18 May 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Fatty acids in seed oil from plants are essential for human nutrients and have been used for industrial purpose. The growing demands of seed oil as food resources and feedstocks for industrial uses have attempted to modify fatty acid composition and to increase oil content in transgenic plants. However, production of unusual fatty acids in transgenic plants are limited, which is not synthesized the level same as original plants. This bottleneck was common for production of several unusual fatty acids in transgenic plants and suggests that there is different for substrate preference in oil metabolic pathway enzymes between host oil plants and original wild plants. Review of acyltransferases involved in acyl-editing and seed oil accumulation of oil plant and wild-plant producing unusual fatty acids will design strategies to maximize the production of unusual fatty acids in transgenic plants. In here, we identified eleven acyltransferase genes in castor based on sequence homology, which will be useful to increase hydroxy unusual fatty acids in transgenic plants.

서론

식물오일의 식용과 산업용으로의 지속적인 수요증가로 인한 식물오일 생산량의 증가와 조성변화를 위한 대사조절에 의한 유전공학적 연구가 가속되고 있다(Drexler et al. 2003). 식물종자오일의 합성대사에 관여하는 유전

자의 클로닝 및 유전자의 기능에 관한 연구가 계속적으로 진행되고 있고 (Drexler et al. 2003), 산업에 유용한 특이지방산을 오일식물에서 경제적 수준으로 생산량을 증가시키는 연구가 진행되고 있지만 (Napier and Graham 2010), 아직까지 산업적으로 경제적인 수준의 생산할 수 있는 대사조절 수준에 크게 미치지 못하는 실정이다. 이에 연구자들은 식물 오일대사 연구를 수행하면서 산업의 원료 물질로 유용한 특이지방산 생산량을 증대시키기 위해서 해결해야 할 주요 문제점들을 알아낼 수 있었다 (Larson et al. 2002; Cahoon et al. 2007). 첫째로는 생산하고자 하는 특이지방산 합성에 사용되는 acyl-CoA와 인지질 (phospholipid) 사이의 기질의 차이 (dichotomy)를 극복하며 인지할 수 있는 새로운 합성유전자 및 두 기질 사이를 순조롭게 전환시키는 효소 유전자의 발굴이 필요하다. 둘째는 형질전환 식물자체가 갖고 있는 내재 acyltransferase 효소단백질은 특이지방산에 대한 기질특이성이 없어서, 원래 생물유래의 특이지방산에 기질 친화성을 갖는 acyltransferase 유전자의 발굴이 필수적일 것으로 기대된다. 최근의 몇몇 연구결과에서 종자오일의 지방산 조성의 변화를 위한 성공적인 대사공학을 위해서는 특이지방산에 대해 효소활성을 갖는 acyltransferase의 역할이 매우 중요함을 보여주고 있다 (Burgal et al. 2008; Shockey et al. 2006). 본 총설에서는 모델식물인 애기장대의 오일합성에 관여하는 acyltransferase 유전자의 기능에 대해 조사하였고, 이들 유전자를 이용하여 산업용 지방산인 리시놀레인산 (ricinoleic acid)을 생산하는 형질전환 오일식물 개발을 위해 피마자의 오일합성에 관여하는 acyltransferase 유전자들의 발굴에 관해 기술하였다.

종자 오일합성에서의 Acyltransferase의 역할

모델식물인 애기장대의 종자오일 합성대사는 Fig. 1과 같

H. U. Kim (✉) · K.-R. Lee · J.-S. Park · K. H. Roh · S. H. Kim · J. B. Kim
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부
(Department of Agricultural Bio-resources, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea)
e-mail: hukim64@korea.kr

다. 식물의 종자오일을 구성하는 중성지질인 triacylglycerol (TAG)는 소포체 (endoplasmic reticulum)에 존재하는 glycerol-3-phosphate (G3P)에 3분자의 acyl-CoA (FA-CoA)가 에스터 결합하여 형성된다. TAG 형성과 TAG의 지방산 조성을 결정하는 데에는 두 가지 주요 대사과정이 있다. 첫 번째, 일반적으로 알려진 Kennedy pathway 또는 sn-glycerol-3-phosphate pathway라 하는 과정으로 acyl-CoA를 기질로 하여 sn-glycerol-3-phosphate에 연속적으로 결합시키는 과정이다 (Kennedy 1961). Fig. 1을 보면 이 대사과정에 관여하는 3종의 acyltransferase가 있다. 즉, ① sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)에 의해 lysophosphatidic acid (LPA)가 합성되며, ② lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAT)에 의해 phosphatidic acid (PA)로 전환된 후 phosphatidic acid phosphatase (PAP)에 의해 dephosphorylation 되어 diacylglycerol (DAG)이 생성되면 마지막으로 ③ diacylglycerol acyltransferase (DGAT)에 의해 TAG가 합성된다. 상기 대사과정은 G3P에 3종의 연속적인 acyltransferase가 소포체에 존재하는 acyl-CoA 지방산을 직접 결합시켜 TAG를 형성하는 과정이다. 두 번째, TAG를 형성하는 대사에는 상기 Kennedy pathway에서 생성된 DAG로부터 phosphatidylcholine: diacylglycerol cholinephosphotransferase (PDCT) (Fig. 1의 ⑤) 반응에 의해 생성된 phosphatidylcholine (PC)이 핵심이 된다. PC로부터의 TAG 형성에 관여하는 효소들은 특이지방산 생산에 매우 중요한 요소로 부각되고 있다. 그 이유는 특이지방산 합성 효소의 대부분의 기질이 PC에 존재하는 지방산이기 때문이다. 즉, 특이지방산 합성의 출발점이 PC이므로 PC에서 TAG로의 전환에 관여하는 효소 유전자의 기능연구가 관심의 초점이 되고 있다. PC에서 합성된 특이

지방산은 PDCT (Fig. 1의 ⑤)에 의해 DAG로 전환된 후 Kennedy pathway의 DGAT (Fig. 1의 ③)에 의해 TAG로 전환된다. 또한 PC에서 합성된 특이지방산이 Kennedy pathway를 거치지 않고 phospholipid: diacylglycerol acyltransferase (PDAT) (Fig. 1의 ④)에 의해 직접 DAG로 전달되어 TAG를 합성할 수 있는 기작이 규명되었다 (Dahlqvist et al. 2000; Stahl et al. 2004). 위의 반응에서 생성되는 lysophosphatidic acid (LPC)는 다시 lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT) (Fig. 1의 ⑥) 반응에 의해 acyl-CoA와 결합하여 다시 PC를 생성한다. 후자의 대사는 일반적 TAG 형성에 관여하는 Kennedy pathway와는 다른 PC에서 합성된 특이지방산이 저장오일로 전환 축적될 수 있는 acyl-editing 기작이라 할 수 있다. 그래서 특이지방산에 기질친화성을 갖는 acyltransferase와 acyl-editing에 관여하는 유전자와 그 효소기작을 밝힐 수 있다면, 오일작물에서 산업용 특이지방산 생산량을 증진시킬 수 있는 전략을 세울 수 있을 것이다.

종자오일합성의 Kennedy pathway에 관여하는 3종의 Acyltransferase의 기질특이성

① GPAT (sn-Glycerol-3-phosphate acyltransferase)

식물에는 엽록체, 미토콘드리아, 소포체에 존재하는 세 가지 종류의 GPAT가 알려져 있다. 이 중 소포체 GPAT가 종자오일합성에 관여한다. 현재까지 애기장대에서 5종의 소포체 GPAT 유전자에 대해 보고되었으나 대부분이 슈베린과 큐틴합성에 관여하고 (Zheng et al. 2003; Beisson et al. 2007; Li et al. 2007), 현재까지 종자오일의 TAG 합성에 관여하는 GPAT 유전자에 대해서는 보고되지 않았다.

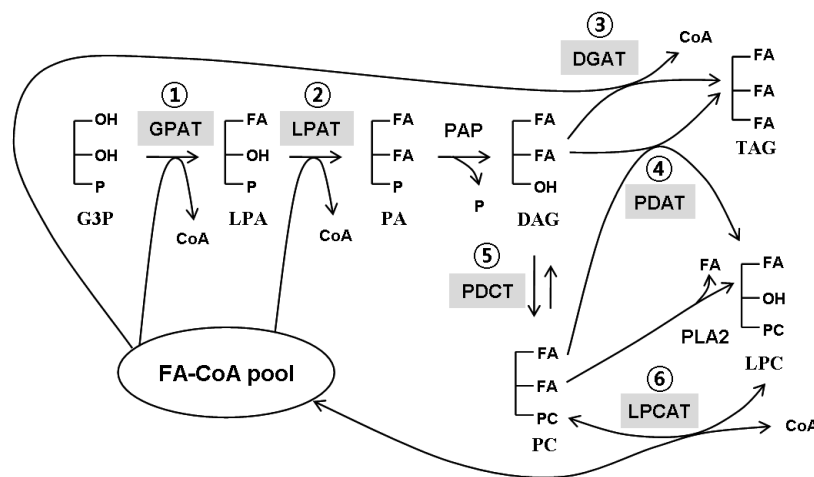


Fig. 1 Generalized scheme for triacylglycerol (TAG) assembly in developing seeds of oil plants. GPAT: sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, LPAT: lysophosphatidic acid acyltransferase, DGAT: diacylglycerol acyltransferase, PDAT: phospholipid:diacylglycerol acyltransferase, PDCT: phosphatidylcholine: diacylglycerol cholinephosphotransferase, LPCAT: lysophosphatidylcholine acyltransferase, CoA: coenzyme A, DAG: sn-1,2-diacylglycerol, FA: Fatty acid, FA-CoA: Fatty acyl-coenzyme A, G3P: sn-glycerol-3-phosphate, LPA, lysophosphatidic acid, LPC, lysophosphatidylcholine, PA: phosphatidic acid, PAP: phosphatidic acid phosphatase, PC: phosphatidylcholine, PLA2: phospholipase A2

소포체 GPAT 효소의 기질특이성에 관한 보고가 있는데, 광범위한 지방산에 대한 기질특이성을 보인다. 즉, 일반적인 식물의 지방산인 포화지방산, 단일불포화지방산, 고도불포화 지방산에 반응하는 것이다 (Christie et al. 1991; Brokerhoff et al. 1966; Lisa et al. 2008; Wiberg et al. 2000).

홍화 (safflower)와 유채에서 분리된 microsomal GPAT는 petroselinic acid (18:1^{Δ6})보다 oleic acid (18:1^{Δ9})에 특이적 선호도를 보인다 (Dutta et al. 1992). 하지만 형질전환 식물에서는 그와 반대로 oleic acid 보다 petroselinic acid가 TAG에 축적되었다 (Suh et al. 2002).

유채에서 중쇄포화지방산 생산을 위해 중쇄포화지방산 합성 유전자가 도입된 형질전환 유채를 만든 경우 TAG의 sn-1 위치에 중쇄포화지방산이 80%까지 차지하였다. 반면 유채의 경우 일반적으로 sn-1 위치에 7%의 포화지방산이 존재하는 것으로 알려져 있음을 고려할 때 일반적으로 GPAT는 세포 내에서 지방산에 대해 특이기질성이 존재하는 것보다는 세포내 존재하는 acyl-CoA 종류에 따라 TAG의 sn-1 위치의 지방산 종류가 결정될 것으로 사료된다 (Voelker and Kinney 2001).

② LPAT (Lysophosphatidic acid acyltransferase)

소포체의 microsomal LPAT는 Kennedy pathway의 acyltransferase 중 가장 기질특이성이 강한 효소이다 (Laurent and Huang 1992). 특이지방산을 합성하는 식물의 LPAT는 이들 특이지방산에 기질선호도를 나타낸다 (Sun et al. 1988; Oo and Huang 1989; Bafor et al. 1990; Bernerth and Frentzen 1990; Cao et al. 1990; Lohden and Frentzen 1992; Davies et al. 1995). LPAT는 저장 오일의 합성뿐 아니라 세포막의 구성성분인 인지질 PC의 지방산 조성에도 중요한 역할을 한다. 불포화지방산에 대한 기질 특이성이 세포막의 불포화도의 조절에 관여할 수 있다.

예를 들면 아마 (flax)의 microsomal LPAT는 불포화 지방산인 18:2-CoA < 18:1-CoA < 18:3-CoA 순의 특이성을 보인다 (Sorensen et al. 2005). 이 특이성은 PC의 sn-2 위치한 18:2 지방산을 Δ15 desaturase인 FAD3에 의해 18:3 지방산으로의 불포화 반응을 유도하는 것과 일치하며, 성숙 아마종자 지방산의 60% 이상이 18:3인 것과 일치한다. 유채를 포함한 몇몇 식물의 LPAT는 18:1과 18:2에 기질선택성을 보이는 반면, 16:0과 18:0에 대해서는 비선택적인 경향이 있다 (Brown et al. 2002). 이와 같이 포화지방산에 대한 차별현상은 주요 오일작물의 일반적인 현상으로 생각된다 (Christie et al. 1991; Brokerhoff et al. 1966).

형질전환 식물에서의 예를 들어보면, 첫째 형질전환 유채에서 비누의 주성분인, 유채에 존재하지 않는 라우르산 (12:0)을 생산하고자 하였을 때 형질전환 유채 종자 오일 TAG의 sn-2 위치에 라우르산이 결합되지 않는 것이 문제가 되었다 (Frentzen 1993; Sun et al. 1988). 결국 캘리포

니아 월계수 (California bay) 식물의 12:0-acyl carrier protein (ACP) thioesterase와 코코넛의 라우르산 특이 LPAT 유전자를 동시에 발현시킴으로써, 유채 TAG의 sn-2 위치에 라우르산을 포함하는 오일을 합성할 수 있었다 (Knutzon et al. 1999). 둘째, 세제, 플라스틱, 코팅의 원료로 유용한 에루스산 (22:1)을 고함유로 생산하는 유채 개발에 있어서, 유채의 내재 LPAT의 경우 sn-2 위치에 에루스산을 거부하는 성질 (Bernerth and Frentzen 1990; Taylor et al. 1991)이 있어 이를 극복하고자 22:1-CoA에 특이성을 갖는 LPAT를 유채에 도입하여 TAG의 sn-2 위치에 에루스산의 증가를 보았다 (Lassner et al. 1995; Brough et al. 1996; Zou et al. 1997; Katavic et al. 2001; Taylor et al. 2002).

③ DGAT (Diacylglycerol acyltransferase)

DGAT는 Kennedy pathway에서 TAG 합성을 결정짓는 마지막 효소이다 (Perry and Harwood 1993). DGAT의 지방산에 대한 기질특이성과 DGAT 유전자의 과다발현에 의한 오일량 증대의 가능성에 대한 연구들이 수행되었다. 종자의 발달단계별 microsomal 분획에 의해 DGAT의 기질특이성을 조사하였다. 홍화에서 DGAT는 특정지방산에 친화성을 보이기보다는 다양한 종류의 DAG와 acyl-CoA에 활성을 보였다 (Ichihara et al. 1982, 1988). 유채, 한련 (*Nasturtium*, *Tropaeolum majus*), 피마자 (castor bean, *Ricinus communis*)와 *Cuphea lanceolata*의 내재 DGAT는 특이지방산에 기질친화성을 보였다 (Lohden et al. 1992; Taylor et al. 1991; Martin and Wilson 1983; Taylor et al. 1992; Vogel and Browse 1996; Yu et al. 2006; Lung and Weselake 2006; He et al. 2004).

초기 생화학적 방법으로 수행한, 기내에서 DGAT의 활성 실험에서는 DGAT1과 DGAT2 간의 기질특이성을 구별하지 못하였으나 DGAT1과 상동성이 없는 DGAT2가 보고되면서 DGAT2에 대한 연구가 진행되었다. Tung tree의 DGAT1과 DGAT2는 미묘한 기질특이성을 보였으며, 효모 발현시스템을 이용한 기질특이성 실험에서는 DGAT2가 특이지방산인 α-oleostearic acid (18:3^{Δ9c,11t,13c})에 보다 친화성을 보였으며 DGAT1과 2는 서로 다른 소포체 도메인에 존재하여 그 기능이 중복되지 않은 독자적 기능이 있음을 세포학적 방법으로 시사하였다 (Shockey et al. 2006). 피마자의 DGAT2는 리시놀레인산에 선택성이 있으며, 리시놀레인산 합성유전자 *FAH12*와 *DGAT2*를 동시에 발현할 때에 애기장대 종자에서 최대 30%의 하이드록시 지방산을 생산하였다 (Burgal et al. 2008). 이 결과는 야생식물에서 유래된 acyltransferase가 형질전환 식물에서 특이 지방산 합성을 증진시키는 데에 중요한 역할을 함을 보여주는 예이다.

비록 상기의 결과는 특이지방산 생산에 있어 DGAT2가 DGAT1보다 중요하다고 할 수 있으나 각 작물마다 어

면 DGAT 효소가 종자 오일의 축적에 주요 역할을 하는지는 불확실하다. 애기장대의 DGAT1이 돌연변이된 경우 약 15%의 종자 오일이 감소됨이 보고되었고 (Katavic et al. 1995), 옥수수에서 오일의 증가와 연관된 *qHO6* 유전자좌는 *DGAT1* 유전자에 1개의 아미노산이 추가되어 오일량의 증가를 보였으며, 이 유전자좌가 열성인 경우 오일량이 감소하는 형질을 보였다 (Zheng et al. 2008). 애기장대와 옥수수에서 DGAT1 효소활성의 감소는 지방산 조성에도 영향을 주어 리놀렌산 (18:3)의 증가를 유도하였다. 이 현상은 DGAT1 활성의 증가로 회복되어 (Zheng et al. 2008; Jako et al. 2001), DGAT1이 특정 지방산에 대한 TAG로의 전환에 관여함을 시사하였다.

형질전환 식물에서 *DGAT1*과 *DGAT2* 유전자의 과발현에 의한 형질전환식물에서의 종자오일 증대에 관한 연구가 수행되었다. 유채 *DGAT1*과 대두 *DGAT2* 유전자 경우 지방산에 대한 기질의 차이에도 불구하고 오일량 증가에 효과가 있는 것으로 증명되었다 (Weselake et al. 2008; Taylor et al. 2009). DGAT1과 DGAT2의 오일량과 오일조성에 관여하는 정확한 기작에 대한 연구는 더욱 이루어져야 한다. *DGAT* 유전자의 인위적 돌연변이체 분석을 통해 효소활성의 증가 및 기질특이성의 변화를 유도하는 연구가 진행되고 있다 (Siloto et al. 2009).

세포막 인지질의 편집에 의한 종자오일합성에 관여하는 Acyltransferase

④ PDAT (Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase)

PDAT의 기질 특이성에 관한 연구는 단지 몇몇 식물종에서 연구되었다. 이들 식물종에서의 PDAT 활성은 고도 불포화 및 특이지방산에 대해 활성을 보였다. 애기장대 microsome 유래 PDAT는 PC의 sn-2 위치에 존재한 리시놀레인 (18:1-OH), 버놀산, 18:3 및 20:4의 지방산에 대해 18:2, 18:1, 10:0 보다 높은 활성을 보였다 (Stahl et al. 2004). 이 결과는 PDAT가 세포막 성분인 인지질에서 특이지방산을 제거하여 저장지질인 TAG 형태로 전환시켜 안정된 세포막지방산 성분 유지에 관여함을 보여준다. 세포막의 인지질에 존재하면 해가 되는 특이지방산을 생산하는 식물의 예를 들면, 피마자, 크레피스 등의 야생식물들이다. 야생식물의 PDAT는 세포막의 인지질로부터 특이지방산을 제거하는 주요 기능을 할 것으로 예측되는 반면 (Banas et al. 2000) 일반식물종의 PDAT 기작은 다른 목적을 가질 것으로 생각된다. 애기장대에서 PDAT는 아마도 종자의 저장오일합성의 양과 지방산 조성을 결정하는 데에는 주요 역할을 하지 않는 것 같다 (Mhaske et al. 2005). 아마도 다른 acyl-editing 기작, 즉 Lands cycle (Lands 1960) 또는 PC와 DAG 사이의 상호간 전환에 관여하는 PDCT (Phosphatidylcholine: diacylglycerol cholinephosphotransferase)

의 작용에 의해 PC와 TAG간의 지방산 조성이 결정될 것으로 생각된다 (Lu et al. 2009).

⑤ PDCT (Phosphatidylcholine: diacylglycerol cholinephosphotransferase)

최근 식물의 PDCT가 모델식물인 애기장대의 *rod1* 돌연변이 분석을 통해 발견되었다 (Lu et al. 2009). 애기장대의 ROD1 (Reduced Oleate Desaturation1)은 18:1 지방산을 함유한 DAG를 PC로 전환하는 주요 효소이다. 위의 반응에 의해 생성된 PC의 18:1 지방산은 18:2와 18:3 고도불포화 지방산으로 전환된 후 PDCT에 의해 다시 DAG로 역전환되고 최종적으로 DGAT에 의해 TAG 형태로 전환된다. 애기장대의 PDCT의 발견은 산업에 유용한 특이지방산에 친화성을 갖는 PDCT의 발견에 길을 열어주었다. 산업에 유용한 특이지방산 합성반응 - hydroxylation, epoxidation, desaturation - 의 기질은 PC의 sn-2 위치에 존재하는 지방산이기 때문이다. 특이지방산 생산을 생산하는 식물 유래의 PDCT는 PC에서 합성된 특이지방산을 TAG로의 원활한 전환을 위해 DAG로 전환할 수 있는 기능을 가질 것으로 추정된다.

⑥ LPCAT (Lysophosphatidylcholine acyltransferase)

세포막의 중요 인지질인 PC 생성과정에서 엽록체에서 합성된 지방산의 대부분이 기존에 알려진 전통적인 대사과정 보다는 acyl-editing이라는 대사과정을 통해 PC의 지방산으로 전환됨이 보고되었다 (Williams et al. 2000; Bates et al. 2007). 이와 같은 실험의 결과는 종자오일 합성에 있어서 LPCAT가 가장 활성이 높은 acyltransferase 중의 하나임을 시사한다 (Williams et al. 2000). 대두, 홍화화과 아마에서 18:1-CoA와 18:2-CoA가 주요기질로 PC에 전환된다. 18:3-CoA는 PC에 낮은 비율로 전환되며, 포화 지방산은 전혀 PC에 전환되지 않았다 (Ichihara et al. 1995). 최근 클로닝된 두 종의 애기장대 *LPCAT* 유전자의 효소는 18:2와 22:0에 대한 기질특이성이 없으나 포화지방산과 단일불포화 지방산인 16:1과 18:1에 기질특이성을 보였다 (Shen et al. 2008). 유채의 소포자배양 세포에서 유래된 LPCAT는 18:1, 18:0, 16:0-CoA의 20 μ M 농도에 활성을 보였으나, 18:1-CoA에는 높은 농도에 활성을 보였다 (Furukawa-Stoffer et al. 2003).

LPCAT의 역방향 효소활성은 PC로부터 acyl-CoA를 유리시켜, acyl-CoA pool를 형성하는 역할을 한다. 홍화의 microsome을 이용한 기내실험에서 CoA와 acyl-CoA 결합 단백질 (Acyl-CoA binding protein: ACBP)의 존재 하에서 PC의 sn-2에 결합되어 있는 동위원소로 레이블된 18:2 지방산이 acyl-CoA pool에 전환되었다 (Stymne and Stobart 1984). 또한 동위원소 feeding 실험을 통해 PC의 sn-1과 sn-2 위치 간에 acyl 지방산이 교환되어, 아마도 이는 LPCAT의

Table 1 Candidate castor acyltransferase genes in synthesis TAG during seed development. Castor genes were identified by sequence homology with those of *Arabidopsis*

Number in pathway	Acyltransferase in <i>Arabidopsis</i> oil synthesis	<i>Arabidopsis</i> genes	Castor putative acyltransferase in oil synthesis	TIGR castor transcript model	No. of deduced AA from transcript
①	AtGPAT2	At5g60620	RcGPAT2	30122.m000357	360
②	AtLPAT2	At3g57650 (Kim et al. 2005)	RcLPAT2A	27810.m000646	396
			RcLPAT2B	30169.m006433	382
③	AtDGAT1	At2g19450	RcDGAT1	29912.m005373	521
	AtDGAT2	At3g51520	RcDGAT2	29682.m000581	341
④	AtPDAT1	At5g13640 (Stahl et al. 2004)	RcPDAT1A	29706.m001305	686
			RcPDAT1B	29912.m005286	660
⑤	AtPDAT2	At3g44830 (Stahl et al. 2004)	RcPDAT2	29991.m000626	612
	AtPDCT	At3g15820 (Lu et al. 2009)	RcPDCT	29841.m002865	285
⑥	AtLPCAT	At1g80950	RcLPCAT1	30170.m014002	363
			RcLPCAT2	30174.m008937	382

양방향 반응에 의해 수행된 것으로 추정되었다 (Bates et al. 2007). LPCAT의 역반응 활성은 정반응보다 활발하지 않아 acylation 비율의 5%로 예상된다 (Ichihara et al. 1995). 식물의 LPCAT의 역방향 반응에 있어서 지방산에 대한 기질특이성에 대한 연구결과는 없다. 쥐의 간조직의 microsome의 실험결과 20:4, 18:0, 18:2-CoA는 ATP를 이용한 acyl-CoA ligase 반응에 의해 생성되기 보다는 주로 세포내 존재하는 지방산의 종류에 의해 유래 되었다 (Sugiura et al. 1995). 그러므로 LPCAT의 정역반응은 특이지방산 기질에 대한 acyl-editing에 관여할 것으로 사료된다. 이 관계를 이해한다면 형질전환식물에서의 특이지방산을 생산하는데 최소 두 종류의 효소유전자를 사용할 경우 발생할 수 있는 효소마다의 기질에 대한 차이 (dichotomy)를 극복할 수 있을 것이다. LPCAT 역방향 반응에 있어서의 acyl-CoA 결합 단백질 (ACBP)의 관여는 기질특이성에 간접적인 영향을 줄 것이다. 왜냐하면 결합단백질의 acyl-CoA에 대한 기질특이성은 LPCAT 반응의 기질에도 영향을 줄 것이기 때문이다.

피마자 오일합성에 관여하는 Acyltransferases

피마자 종자오일의 90%가 리시놀레인 지방산으로 구성되어 있다. 리시놀레인 지방산 (18:1-OH)은 12번째 탄소 ($\Delta 12$)위치에 하이드록시기 (-OH)가 붙어 있어 산업적 원료로 중요한 특성이 있는 지방산이다. 하지만 피마자 자체를 작물로 개발하기 어려운 단점이 있어 리시놀레인 지방산을 합성하는 유전자를 오일작물에 도입하여 리시놀레인 지방산을 생산하는 작물을 개발하려는 노력이 진행되고 있다 (Lee and Kim 2009). 하지만 현재까지는 모델식

물인 애기장대에서 *FAH12* 합성유전자를 도입시킨 경우 최대 17%, 최근에 피마자 *DGAT2* 유전자를 추가로 도입한 경우 최대 30%의 리시놀레인 지방산이 생산되었다 (Burgal et al. 2008). 하지만 산업적으로 경제적 수준의 리시놀레인 지방산 생산을 위해서는 더욱 연구가 필요하다. 오일식물 및 모델식물인 애기장대에는 특이지방산인 리시놀레인 지방산을 종자오일로 전환에 관여하는 유전자가 원래 피마자의 오일합성에 관여하는 유전자와는 다른 것으로 생각되어, 피마자의 오일합성에 관여하는 acyltransferase와 인지질의 편집 (editing)에 관여하는 acyltransferase 유전자들을 발굴 도입하면 오일식물에서 리시놀레인 지방산 생산을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 현재까지 보고되어 있는 종자오일합성에 관여하는 애기장대의 acyltransferase 유전자를 이용하여 피마자 유전자데이터베이스에서 피마자 종자오일생산에 관여할 것으로 추정되는 11개의 acyltransferase 유전자를 발굴하였다 (Table 1). 본 연구실에서는 발굴한 11종의 유전자들에 대한 효소활성을 조사하고 이들 유전자와 리시놀레인 지방산 합성유전자인 *FAH12*를 애기장대에 동시에 도입하여 리시놀레인 지방산 생산 증대에 관한 연구를 수행하고 있다.

적 요

식물 종자오일의 지방산은 인간에 필수 지방산을 공급하는 식용 및 생필품 생산에 필요한 다양한 산업원료로 사용된다. 식물 오일의 식용 및 산업용 적합성과 경제성을 극대화하기 위해 유전공학에 의한 종자오일의 양과 지방산 조성 변형을 위한 대사조절연구가 계속 진행되고

있다. 하지만 식물에 일반적으로 존재하지 않는, 산업적으로 유용한 특이지방산의 합성과 종자오일로의 축적은 한계가 있음이 알려져 있다. 그 이유는 재배가 용이하며 생산성이 높은 오일식물의 acyltransferase가 특이지방산에 대한 기질특이성이 떨어지며 또한 특이지방산에 대한 세포막지질에서 종자오일로 전환시키는 편집기작¹⁾ (editing mechanism)이 없기 때문으로 사료된다. 최근에 모델식물의 종자오일의 축적에 관여하는 acyltransferase에 관한 유전자들이 클로닝되었고, 특이지방산이 합성되는 인지질에서의 편집기작에 관여하는 acyltransferase 유전자들이 밝혀져 이들 유전자들의 정보를 이용하여 특이지방산을 효과적으로 생산-증진할 수 있는 기술이 개발될 수 있을 것으로 기대한다. 피마자오일의 주성분인 산업용 특이지방산인 리시놀레인 지방산을 오일식물에서 생산하기 위해 이에 관여할 것으로 추정되는 11개의 acyltransferase 유전자를 피마자 유전체 데이터베이스에서 존재함을 확인하였다. 이들 유전자들의 도입에 의해 형질전환 식물이 갖고 있지 않은 리시놀레인산에 대한 기질 특이성을 부여하여 종자오일 내의 특이지방산의 생산을 증가시킬 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 기관고유 과제의 연구비 지원 (과제 번호: PJ0067152010)으로 수행되었습니다.

인용문헌

- Bafor M, Stobart AK, Stymne S (1990) Properties of the glycerol acylating enzymes in microsomal preparations from the developing seeds of safflower (*Carthamus tinctorius*) and turnip rape (*Brassica campestris*) and their ability to assemble cocoa-butter type fats. *J Am Oil Chem Soc* 67:217-225
- Banas A, Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Stymne S (2000) The involvement of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases in triacylglycerol production. *Biochem Soc Trans* 28:703-705
- Bates PD, Ohlrogge JB, Pollard M (2007) Incorporation of newly synthesized fatty acids into cytosolic glycerolipids in pea leaves occurs via acyl editing. *J Biol Chem* 282:31206-31216
- Beisson F, Li Y, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB (2007) The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:351-368
- Bernerth R, Frentzen M (1990) Utilization of erucoyl-CoA by acyltransferases from developing seeds of *Brassica napus* L. involved in triacylglycerol biosynthesis. *Plant Sci* 67:21-28
- Brokerhoff H, Yurkowski M (1966) Stereospecific analyses of several vegetable fats. *J Lipid Res* 7:62-64
- Brough CL, Coventry JM, Christie WW, Kroon JT, Brown AP, Barsby TL, Slabas AR (1996) Towards the genetic engineering of triacylglycerols of defined fatty acid composition: major changes in erucic acid content at the sn-2 position affected by the introduction of a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Limnanthes douglasii* into oil seed rape. *Mol Breed* 2:133-142
- Brown AP, Slabas AR, Denton H (2002) Substrate selectivity of plant and microbial lysophosphatidic acid acyltransferases. *Phytochemistry* 61:493-501
- Burgal J, Shockey J, Lu C, Dyer J, Larson T, Graham I, Browse J (2008) Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnol J* 6:819-831
- Cahoon EB, Shockey JM, Dietrich CR, Gidda SK, Mullen RT and Dyer JM (2007) Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux. *Curr Opin Plant Biol* 10:236-244
- Cao YZ, Oo KC, Huang AH (1990) Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*). *Plant Physiol* 94:1199-1206
- Christie WW, Nikolova-Damyanova B, Laakso P, Herslof B (1991) Stereospecific analysis of triacyl-sn-glycerols via resolution of diastereomeric diacylglycerol derivatives by high performance liquid chromatography on silica. *J Am Oil Chem Soc* 68:695-701
- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne S (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6487-6492
- Davies HM, Hawkins DJ, Nelsen JS (1995) Lysophosphatidic acid acyltransferase from immature coconut endosperm having medium chain length substrate specificity. *Phytochemistry* 39:989-996
- Drexler H, Spiekermann P, Meyer A, Domergue F, Zank T, Sperling P, Abbadi A, Heinz E (2003) Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: strategies, problems and first results. *J Plant Physiol* 160:779-802
- Dutta PC, Appelqvist L, Stymne S (1992) Utilization of petroselinic acid (C18:1Δ6) by glycerol acylation enzymes in microsomal preparations of developing embryos of carrot (*Daucus carota* L.), safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and oil rape (*Brassica napus* L.) *Plant Sci* 81:57-64
- Frentzen M (1993) Acyltransferases and triacylglycerols. In: T.S. Moore Jr., Editor, *Lipid Metabolism in plants*. CRC Press, 195-230

1) 편집기작: 세포막 지질에 해가 되는 지방산 즉 특이지방산을 선택적으로 제거하는 기작

- Furukawa-Stoffer TL, Boyle RM, Thomson AL, Sarna MA, Weselake RJ (2003) Properties of lysophosphatidylcholine acyltransferase from *Brassica napus* cultures. *Lipids* 38: 651–656
- He X, Turner C, Chen GQ, Lin JT, McKeon TA (2004) Cloning and characterization of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from castor bean. *Lipids* 39:311–318
- Ichihara K, Takahashi T, Fujii S (1988) Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds - its influences on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis. *Biochim Biophys Acta* 958:125–129
- Ichihara K, Mae K, Sano Y, Tanaka K (1995) 1-Acylglycerophosphocholine O-acyltransferase in maturing safflower seeds. *Planta* 196:551–557
- Ichihara K, Noda M (1982) Some properties of diacylglycerol acyltransferase in a particulate fraction from maturing safflower seeds. *Phytochemistry* 21: 1895–1901
- Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, Covello PS, Taylor DC (2001) Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol* 126:861–874
- Katavic V, Reed DW, Taylor DC, Giblin EM, Barton DL, Zou J, Mackenzie SL, Covello PS, Kunst L (1995) Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced mutation in Arabidopsis thaliana affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol* 108: 399–409
- Katavic V, Friesen W, Barton DL, Gossen KK, Giblin EM, Luciw T, An J, Zou J, MacKenzie SL, Keller WA, Males D Taylor DC (2001) Improving erucic acid content in rapeseed through biotechnology: What can the Arabidopsis FAE1 and the yeast SLC1-1 genes contribute? *Crop Sci* 41:739–747
- Kennedy EP (1961) Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc Am Soc Exp Biol* 20:934–940
- Kim HU, Li Y, Huang AH (2005) Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Cell* 17:1073–1089
- Knutzon DS, Hayes TR, Wyrick A, Xiong H, Maelor Davies H, Voelker TA (1999) Lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut mediates the insertion of laurate at the sn-2 position of triacylglycerols in lauric rapeseed oil and can increase total laurate levels. *Plant Physiol* 120:739–746
- Lands WE (1960) Metabolism of glycerolipids. 2. Enzymatic acylation of lysolecithin. *J Biol Chem* 235:2233–2237
- Larson TR, Edgell T, Byrne J, Dehesh K, Graham IA (2002) Acyl-CoA profiles of transgenic plants that accumulate medium-chain fatty acids indicate inefficient storage lipid synthesis in developing oilseeds. *Plant J* 32:519–527
- Lassner MW, Levering CK, Davies HM, Knutzon DS (1995) Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil. *Plant Physiol* 109:1389–1394
- Laurent P, Huang AH (1992) Organ- and development-specific acyl coenzyme A lysophosphatidate acyltransferases in palm and meadowfoam. *Plant Physiol* 99:1711–1715
- Lee KR, Kim HU (2009) Metabolic engineering for production of industrial oils in transgenic plants. *J Plant Biotechnol* 36:97–105
- Li Y, Beisson F, Koo AJ, Molina I, Pollard M, Ohlogge J (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18339–18344
- Lisa M, Holcapek M (2008) Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1198–1199:115–130
- Lohden I, Frentzen M (1992) Triacylglycerol biosynthesis in developing seeds of *Tropaeolum majus* L. and *Limnanthes douglasii* R. Br. *Planta* 188:215–224
- Lu C, Xin Z, Ren Z, Miquel M, Browse J (2009) An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the ROD1 gene of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18837–18842
- Lung SC, Weselake RJ (2006) Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* 41:1073–1088
- Martin BA, Wilson RF (1983) Properties of diacylglycerol acyltransferase from spinach leaves. *Lipids* 18:1–6
- Mhaske V, Beldjilali K, Ohlogge J, Pollard M (2005) Isolation and characterization of an Arabidopsis thaliana knockout line for phospholipid:diacylglycerol transacylase gene (At5g13640). *Plant Physiol Biochem* 43:413–417
- Napier JA, Graham IA (2010) Tailoring plant lipid composition: designer oilseeds come of age. *Curr Opin in Plant Biol* 13:1–8
- Oo KC, Huang AH (1989) Lysophosphatidate acyltransferase activities in the microsomes from palm endosperm, maize scutellum, and rapeseed cotyledon of maturing seeds. *Plant Physiol* 91:1288–1295
- Perry HJ, Harwood JL (1993) Changes in the lipid content of developing seeds of *Brassica napus*. *Phytochemistry* 32: 1411–1415
- Shen W (2008) Functional study of lysophosphatidylcholine acyltransferase in Arabidopsis. Poster presented at 18th International Symposium on Plant Lipids, Bordeaux, France, July 20–25
- Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, Kuan JC, Dhanoa PK, Bland JM, Rothstein SJ, Mullen RT, Dyer JM (2006) Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 18: 2294–2313
- Siloto RM, Truksa M, Brownfield D, Good AG, Weselake RJ (2009) Directed evolution of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase: development and characterization of Brassica

- napus* DGAT1 mutagenized libraries. Plant Physiol Biochem 47:456–461
- Sorensen BM, Furukawa-Stoffer TL, Marshall KS, Page EK, Mir Z, Forster RJ, Weselake RJ. (2005) Storage lipid accumulation and acyltransferase action in developing flaxseed. Lipids 40:1043–1049
- Stahl U, Carlsson AS, Lenman M, Dahlqvist A, Huang B, Banas W, Banas A, Stymne S (2004) Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. Plant Physiol 135:1324–1335
- Stymne S, Stobart AK (1984) Evidence for the reversibility of the acyl-CoA-lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. Biochem J 223: 305–314
- Sugiura T, Kudo N, Ojima T, Kondo S, Yamashita A, Waku K (1995) Coenzyme A dependent modification of fatty acyl chains of rat liver membrane phospholipids - possible involvement of ATP independent acyl-CoA synthesis. J Lipid Res 36:440–450
- Suh MC, Schultz DJ, Ohlrogge JB (2002) What limits production of unusual monoenoic fatty acids in transgenic plants? Planta 215:584–595
- Sun C, Cao YZ, Huang AH (1988) Acyl Coenzyme A preference of the glycerol phosphate pathway in the microsomes from the maturing seeds of palm, maize, and rapeseed. Plant Physiol 88:56–60
- Taylor DC, Weber N, Barton DL, Underhill EW, Hogge LR, Weselake RJ, Pomeroy MK (1991) Triacylglycerol bioassembly in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv Reston. Plant Physiol 97:65–79
- Taylor DC, Barton DL, Rioux KP, Mackenzie SL, Reed DW, Underhill EW, Pomeroy MK, Weber N (1992) Biosynthesis of acyl lipids containing very-long chain fatty acids in microspore-derived and zygotic embryos of *Brassica napus* L. cv Reston. Plant Physiol 99:1609–1618
- Taylor DC, Katavic V, Zou L, MacKenzie SL, Keller WA, An J, Friesen W, Barton DL, Pedersen KK, Giblin EM, Ge Y, Dauk M, Sonntag C, Luciw T, Males D (2002) Field testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield. Mol Breed 8:317–322
- Taylor DC, Zhang Y, Kumar A, Francis T, Giblin EM, Barton DL, Ferrie JR, Laroche A, Shah S, Zhu W, Snyder CL, Hall L, Rakow G, Harwood JL, Weselake RJ (2009) Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of DGAT1 to produce canola with increase seed oil content under field condition. Botany 87: 533–543
- Voelker T, Kinney AJ (2001) Variations in the biosynthesis of seed storage lipids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52:335–361
- Voelker TA, Hayes TR, Cranmer AM, Turner JC, Davies HM (1996) Genetic engineering of a quantitative trait - metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed. Plant J 9:229–241
- Vogel G, Browse J (1996) Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase - substrate specificities at a key branch point in seed lipid metabolism. Plant Physiol 110:923–931
- Weselake RJ, Shah S, Tang M, Quant PA, Snyder CL, Furukawa-Stoffer TL, Zhu W, Taylor DC, Zou J, Kumar A, Hall L, Laroche A, Rakow G, Raney P, Moloney MM, Harwood JL (2008) Metabolic control analysis is helpful for informed genetic manipulation of oilseed rape (*Brassica napus*) to increase seed oil content. J Exp Bot 59:3543–3549
- Wiberg E, Edwards P, Byrne J, Stymne S, Dehesh K (2000) The distribution of caprylate, caprate and laurate in lipids from developing and mature seeds of transgenic *Brassica napus* L.. Planta 212:33–40
- Williams JP, Imperial V, Khan MU, Hodson JN (2000) The role of phosphatidylcholine in fatty acid exchange and desaturation in *Brassica napus* L. leaves. Biochem J 349: 127–133
- Yu KS, McCracken CT Jr, Li R, Hildebrand DF (2006) Diacylglycerol acyltransferases from *Vernonia* and *Stokesia* prefer substrates with vernolic acid. Lipids 41:557–566
- Zheng Z, Xia Q, Dauk M, Shen W, Selvaraj G, Zou J (2003) *Arabidopsis* AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. Plant Cell 15:1872–1887
- Zheng P, Allen WB, Roesler K, Williams ME, Zhang S, Li J, Glassman K, Ranch J, Nubel D, Solawetz W, Bhatramakki D, Llaca V, Deschamps S, Zhong GY, Tarczynski MC, Shen B (2008) A phenylalanine in *DGAT* is a key determinant of oil content and composition in maize. Nat Genet 40:367–372
- Zou J, Katavic V, Giblin EM, Barton DL, MacKenzie SL, Keller WA, Hu X, Taylor DC (1997) Modification of seed oil content and acyl composition in the *Brassicaceae* by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene. Plant Cell 9:909–923