

식물 지방산 생산량의 증진을 위한 생명공학 연구현황

이경렬 · 최윤정 · 김순희 · 노경희 · 김종범 · 김현욱

Current biotechnology for the increase of vegetable oil yield in transgenic plants

Kyeong-Ryeol Lee · Yunjung Choi · Sun Hee Kim · Kyung Hee Roh · Jong-Bum Kim · Hyun Uk Kim

Received: 7 October 2011 / Accepted: 28 October 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The most part of vegetable oils is accumulated as storage lipid, triacylglycerol (TAG) in seed and used as energy source when seed is germinated. It is also used as essential fatty acids and energy source for human and animal. Recently, vegetable oils have been more and more an important resource because of the increasing demand of vegetable oils for cooking and industrial uses for bio-diesel and industrial feedstock. In order to increase vegetable oils using biotechnology, over-expressing or repressing the regulatory genes involved in the flow of carbon into lipid biosynthesis is critical during seed development. In this review, we described candidate genes may influence oil amount and investigate their potential for oil increase. Genes involved in the regulation from biosynthesis of fatty acids to the accumulation oils in seed can be classified as follows: First, genes play a role for synthesis precursor molecules for TAG. Second, genes participate in fatty acid biosynthesis and TAG assembly. Lastly, genes encodes transcription factors involved in seed maturation and accumulation of seed oil. Because factors/genes determining oil quantity in seed is complex as mentioned, recently regulation of transcription factors is being considered more favorable approach than manipulate multiple genes for increasing oil in transgenic plants. However, it should be figured out the problem that bad agricultural traits induced by the overexpression of transcription factor gene.

서론

식물에 존재하는 일반적인 지방산은 탄소 16~18개의 길이에 carboxy기를 갖고 있는 유기산이다. 식물의 지질 (lipid)은 성질에 따라 극성인 막지질 (membrane lipid)과 중성인 저장지질로 나눌 수 있다. 막지질은 엽록체막에 존재하는 당지질 (galactolipid)과 세포막에 존재하는 인지질 (glycerophospholipid와 sphingolipid) 등으로 구분할 수 있다. 지방산은 이 지질들의 가장 중요한 구성성분으로 glycerol 또는 sphingosine 등과 ester 결합을 하여 존재한다. 이런 형태 외에도 지방산은 유리산 (free fatty acid)으로 존재하기보다 acyl-carrier protein (ACP), coenzyme A (CoA) 등과 thioester 결합을 하여 지질대사의 기질로 사용된다.

식물의 종자의 거의 대부분의 지방산은 glycerol과 결합하여 triacylglycerol (TAG) 형태로 축적되어있으며 이는 종자가 발아할 때에 필수적인 에너지공급원이다. 동물과 인간들도 이를 섭취하여 필수지방산과 에너지를 공급받아왔으며 최근에는 식용유의 수요증가와 더불어 바이오디젤과 산업원료 등의 산업적 수요도 증가함에 따라 더욱 중요한 자원이 되고 있다. 현재 세계적으로 식물에서 생산되는 지질의 80% 가량은 식용으로, 20% 가량은 산업적으로 사용되고 있다 (Metzger and Bornscheuer 2006). FAO (Food and Agriculture Organization)의 통계에 의하면 현재 가장 많이 생산되는 유지작물은 오일팜이고 그 다음은 대두, 유채 등이다 (<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>). 일반적으로 식물의 종자유와 세포막 지질을 구성하는 지방산은 팔미트산 (Palmitic acid, 16:0), 스테아르산 (Stearic acid, 18:0), 올레산 (Oleic acid, 18:1), 리놀레산 (Linoleic acid, 18:2), 알파리놀렌산 (α -Linolenic acid, 18:3)의 5가지이다. 세포막과 엽록체막의 지방산의 구성은 지질의 종류가 다르듯이 약간 다른데 엽록체막의 당지질

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

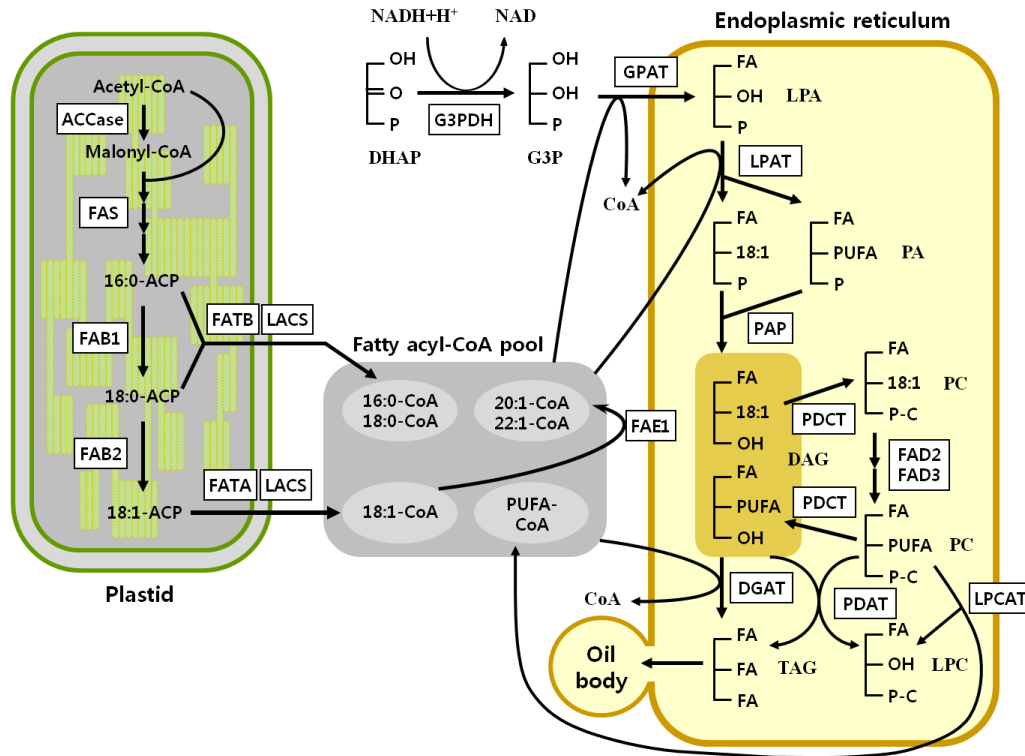


Fig. 1 Fatty acid biosynthesis and TAG assembly in oilseed. In plastid, Acetyl-CoA converts to malonyl-CoA by ACCase. Subsequently, Long-chain saturated fatty acid, 16:0-ACP and 18:0-ACP are elongated by multiple FAS (fatty acid synthase) enzymes and FAB1 (fatty acid biosynthesis 1) from malonyl-ACP and 18:0-ACP is desaturated by FAB2. These long-chain acyl-ACPs are converted to long-chain acyl-CoAs by thioesterases, FATA (fatty acyl-ACP thioesterase A) and FATB, and LACS (long-chain acyl-CoA synthetase). Glycerol backbone, G6P (glycerol-6-phosphate) formation is catalyzed by G3PDH (glycerol-6-phosphate dehydrogenase) from DHAP (dihydroxyacetone phosphate). In endoplasmic reticulum (ER), several acyltransferases including GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase), LPAT (lysophosphatidic acid acyltransferase), DGAT (diacylglycerol acyltransferase) and PDAT (phosphatidylcholine:diacylglycerol acyltransferase), and other many enzymes including PDCT (phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase), PAP (phosphatidic acid phosphatase), FAD2 (fatty acid desaturase 2), FAD3, FAE1 (fatty acid elongase 1) and LPCAT (lysophosphatidic acid acyltransferase), contribute to TAG and PC (phosphatidylcholine) formation. Finally, TAG is deposited into oil body budded from ER membrane

에는 16:1, 16:2, 16:3 등의 불포화지방산도 포함하고 있다. 앞에 언급한 5가지 일반지방산 외에 탄소길이가 다르거나 불포화도 또는 불포화 위치가 다르거나 특정한 기능을 갖고 있는 지방산도 발견되는데 이를 특이지방산 (Unusual fatty acid)이라고 한다. 특이지방산은 특정 식물종의 종자에서만 발견되는데 예를 들면, 십자화과에서는 에루스산 (Erucic acid, 22:1)이, 쿠페아 등에서는 탄소 8~12개 길이의 중쇄지방산 (Medium-chain fatty acid)이, 피마자에서는 리시놀레인산 (Ricinoic acid, 12-hydroxy-18:1)이 존재한다.

식물에서 지방산 생합성은 색소체 (plastid)에서 시작되고 적당한 크기가 되면 소포체로 이동하여 막지질 또는 저장지질의 구성성분이 된다. 좀 더 자세히 살펴보자면, 색소체에서 acetyl-CoA가 acetyl-CoA carboxylase (ACCase)에 의해 malonyl-CoA가 되고 ACP와 결합하여 malonyl-ACP가 되고 계속해서 malonyl-CoA에서 탄소 2개를 계속 전달받아 16:0-ACP로 길어지고 16:0-ACP는 16:0-ACP elongase에 의해 18:0-ACP가 되고 이것은 다시 18:0-ACP Δ 9-desaturase에 의해 18:1-ACP가 된다. 16:0-ACP와 18:0-ACP

는 fatty acyl-ACP thioesterase B (FATB)에 의해, 18:1-ACP는 FATA에 의해 ACP와의 thioester 결합이 떨어져나가면서 세포질로 방출된다. 지방산은 색소체 외부에서는 coenzyme A (CoA)와 결합된 상태인 acyl-CoA로 존재하며 색소체 밖의 지질대사의 기질로 사용된다. 소포체막에서 acyl-CoA는 glycerol 골격에 ester 결합을 하면서 막지질 또는 저장지질의 구성성분이 된다. 16:0-CoA와 18:0-CoA는 식물의 큐틴 (cutin)의 구성성분이 되기도 하며 18:1-CoA는 Fatty Acid Elongase 1 (FAE1)에 의해 20:1-CoA 또는 22:1-CoA로 연장되어 저장지질에 결합되기도 한다. 특히 식물유의 가장 큰 특성이 다중불포화 지방산 (polyunsaturated fatty acid)을 만들어지는 과정을 보면 인지질인 phosphatidylcholine (PC)의 sn-2 위치에 결합된 18:1이 Fatty Acid Desaturase 2 (FAD2)에 의해 18:2가 되고 다시 FAD3에 의해 18:3이 된다 (Okuley et al. 1994). 이렇게 만들어진 glycerophospholipid들은 종자에서 diacylglycerol (DAG)로 전환되며 diacylglycerol acyltransferase (DGAT)에 의해 TAG로 전환되어 지질체 (Oil body)에 저장된다 (Fig. 1).

식물 종자유 생성은 크게 4단계로 세분화되어 조절될 수 있으며, 각 단계의 조절에 의해 종자유 지방산의 생산량이 결정될 것으로 생각된다. 4단계는 다음과 같다. (1) TAG 합성에 필요한 전구체의 증진대사, (2) TAG의 주성분인 지방산의 합성 조절과 지방산의 TAG로의 전환에 관여하는 대사, (3) 종자유 발달 과정 중 지방과 전분, 단백질 생산의 상호 대사 조절, (4) TAG 합성에 총체적으로 조절할 수 있는 전사조절 단계이다. 본 총설에서는 식물 종자유인 TAG 생성에 관여하는 대사과정을 4단계로 나누어 식물의 지방산 생성에 관련된 유전자들에 대해 알아보고 이들을 과발현했을 때, 또 이들 유전자의 발현을 조절하는 전사인자를 과발현 하였을 때 종자유 함량이 증가된 연구 사례들을 소개하고 미래의 연구전망에 대해서 논하고자 한다.

TAG 구성성분의 전구체 합성 유전자의 과다발현을 통한 종자유 지방산 함량 증진

TAG는 1분자의 glycerol-3-phosphate (G3P)와 3분자의 acyl-CoA가 결합하여 만들어지므로 TAG의 양을 늘리기 위해서는 G3P와 acyl-CoA의 양을 늘리면 될 것으로 생각되었다. 실제로 Vigeolas와 Geigenberger (2004)는 미숙종자에서 TAG가 급속히 축적되는 시기에 G3P의 공급이 따라가지 못함을 보았고 유체에 glycerol을 공급했을 때 미숙종자에서 G3P의 양이 증가하면서 TAG 축적량을 늘리는 결과를 얻었다. 이 연구그룹은 이어진 후속실험에서 G3P를 만들어내는 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 코딩하는, 효모의 *gpd1* 유전자를 유체 미숙종자에서 과발현 하였을 때 G3P의 양이 3~4배 증가하였고 종자유 지방산 함량이 40% 증가됨을 보여주었다 (Vigeolas et al. 2007).

위에 언급하였듯이 색소체에서 acetyl-CoA가 ACCase에 의해 생합성된 malonyl-CoA는 탄소 16~18개 지방산의 최초 전구체가 된다. 그 외에도 지방산 생합성 경로의 다른 효소가 많이 관여하지만 가장 초기에 있는 ACCase를 과발현하는 것이 효과적일 것이라 예상되었다. ACCase는 쌍자엽식물의 세포질과 화분과 식물의 색소체와 세포질에서는 homodimer로, 그 외 식물종의 색소체에서는 heterotetramer로 존재하는데 (Ohlrogge and Browse 1995), Roesler 등 (1997)은 애기장대 (*Arabidopsis*)의 세포질의 homomeric ACCase 유전자 *ACCI*를 색소체에 이동되도록 색소체이동 단백질서열 (rubisco transit peptide sequence)을 붙여서 유체를 형질전환하였을 때 ACCase 활성이 10~20배 증가했으며 종자유 함량이 5% 증가됨을 보고하였다.

지질합성에 관여하는 유전자의 과다발현을 통한 종자유 지방산 함량 증진

종자유에서 TAG 생합성은 G3P에 3개의 acyl-CoA가 단계적

으로 서로 다른 3종의 acyltransferase에 의해 ester 결합되면서 이루어진다. 이것을 Kennedy 경로라고 하며, TAG 합성의 최종 대사이다. 이 경로는 소포체에서 G3P의 *sn-1* 위치가 glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)에 의해 acylation되어 lysophosphatidic acid (LPA)가 되고, LPA의 *sn-2* 위치가 두 번째 lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAT)에 의해 acylation되어 phosphatidic acid (PA)가 되며 PA는 phosphatidic acid phosphatase (PAP)에 의해 탈인산화되면서 diacylglycerol (DAG)을 형성하고 diacylglycerol acyltransferase (DGAT)에 의해 *sn-3* 위치가 acylation되면서 TAG가 생성된다 (Fig. 1, Kennedy 1961). TAG 생합성의 주경로인 Kennedy 경로의 3가지 주요 acyltransferase 외에도 PC의 *sn-2* 위치의 지방산을 직접 DAG에 전달하여 TAG를 합성하는 acyltransferase인 phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT)도 있다 (Fig. 1). 이렇게 다수의 acyltransferase 유전자가 클로닝되어 그 기능이 연구되고 있으며 TAG가 저장되는 지질체는 미숙종자의 소포체에서 만들어지기 때문에 TAG 생합성에 관여하는 acyltransferase는 모두 미숙종자에서 발현되며 소포체에 존재할 것으로 생각된다. TAG 생합성에 직접적으로 관련된 acyltransferase를 찾아내어 유지작물의 미숙종자에서 과발현시킨다면 종자의 지방산 함량을 증진할 수 있을 것이다. 그런 의미에서 TAG 생합성에 관련된 acyltransferase와 이를 형질전환하여 종자유 지방산 함량이 증진된 연구 사례를 보도록 하겠다.

소포체 GPAT는 애기장대에 5개가 있는 것으로 동정되었으나 (Zheng et al. 2003) 슈베린 (suberin)과 큐틴 생합성에 관여하는 것들이 대부분이고 종자의 TAG 생합성에 관여하는 GPAT을 밝히지 못했다 (Kim et al. 2005; Beisson et al. 2007). 그러므로 GPAT을 이용하여 종자유 함량을 증진하는 연구는 보고된 바는 아직 없다.

소포체 LPAT는 애기장대에서 5개가 존재하고 이 중 LPAT2가 종자의 TAG 생합성에 관여하며 이 유전자의 돌연변이는 자성불임을 유발하였다 (Kim et al. 2005). 또한 LPAT는 일반적으로 특정지방산에 대한 기질선택성을 갖고 있다 (Kim et al. 2005; Brown et al. 2002; Lassner et al. 1995; Knutzon et al. 1999). 대부분의 식물이 18:1-CoA와 18:2-CoA에 대한 선택성이 강하고 포화지방산이나 탄소길이가 16개보다 짧거나 18개보다 긴 지방산에 대해서는 선택성이 낮다. 이는 LPAT의 기능으로 만들어진 PA가 결국 PC를 거쳐 불포화되면서 막지질과 저장지질의 불포화도가 조절되는데 18:1이나 18:2가 결합되어야만 각각 18:2나 18:3으로 불포화될 수 있기 때문이다. 재래종 유체에 가장 많은 22:1의 비율을 높이기 위해 효모에서 동정된, *sn-2* 위치에 22:1에 대한 특이성이 높은 LPAT 유전자인 *SLCI-1*을 35S 프로모터로 재래종 유체에서 과발현하였을 때 22:1이 약 10% 증가하였으며 더불어

종자지방산 함량도 8~48% 증가한 결과도 얻었다 (Zou et al. 1997). 최근에는 유채의 LPAT isozyme 유전자 2개를 애기장대에서 종자특이적인 napin 2S2 프로모터로 발현 되도록 형질전환하여 종자 무게와 종자지방산이 각각 평균 6%, 13% 증가된 결과를 얻었다 (Maisonneuve et al. 2010).

DGAT는 식물에서 3종류가 밝혀졌는데 이들은 다른 acyltransferase와는 달리 상동성이 적고 서로 다른 3차 구조를 갖고 있다. DGAT1과 DGAT2는 소포체막에 존재하는 효소이지만 DGAT1이 10개의 membrane spanning domain을 갖는 반면 (Lung and Weselake 2006) DGAT2는 2개를 가지며 (Shockey et al. 2006), 이들은 각각 소포체에서 결합하는 하위도메인이 다른 것으로 밝혀졌다 (Shockey et al. 2006). DGAT3는 수용성으로 땅콩의 자엽에서 동정되었다 (Saha et al. 2006). 피마자에서 DGAT1과 DGAT2가 동정되었는데 (He et al. 2004a, He et al. 2004b; Kroon et al. 2006) 이 중 피마자 DGAT2는 리시놀레인산에 특이적인 것으로 밝혀졌다 (Kroon et al. 2006, Burgal et al. 2008). 피마자의 리시놀레인산 합성유전자인 *Fatty Acid 12-Hydroxylase (FAH12)* 유전자를 클로닝하여 애기장대에 형질전환한 결과 리시놀레인산 비율이 종자지방산의 17%였으나 (Broun and Somerville. 1997), 피마자 *DGAT2* 유전자를 동시에 과발현한 결과 약 30%로 높아졌다 (Burgal et al. 2008). 또한 유동나무 (*Tung tree*)의 *DGAT2*는 이 식물의 종자지방산의 약 80%를 차지하는, 공액지방산 (conjugated fatty acid) 이자 특이지방산인 알파엘레오스테아르산 (18:3^{△9,11,13})에 높은 선택성을 보였다(Shockey et al. 2006). 이처럼 *DGAT2*는 특이지방산을 비롯한 다중불포화지방산에 대해 선택성이 높음을 알 수 있었다 (Jako et al. 2001).

DGAT는 다른 어떤 효소보다 종자의 지질함량 증진에 깊은 연관이 있다. 애기장대의 *DGAT1*이 돌연변이 된 AS11은 종자유 함량이 15% 감소하였고 (Katavic et al. 1995, Zou et al. 1999) 이후 실험에서 AS11 돌연변이는 종자유 함량과 단일불포화지방산의 감소를 가져왔으며 애기장대에 *DGAT1*을 종자특이적으로 과발현시켰을 때 종자 수확량과 무게가 증가했으며 종자유 함량은 약 20% 증대되었다고 보고되었다 (Jako et al. 2001). 한련화 (*Tropaeolum majus*)의 *DGAT1*을 애기장대와 재래종 유채에서 과발현하였을 때 종자유 함량이 11~30% 증가되었고 site-directed mutagenesis를 통해 *DGAT1* 활성이 38~80% 증가하였으며 이를 애기장대에서 과발현하였을 때 종자유 함량이 20~50% 증가된 결과를 얻었다 (Xu et al. 2008) 옥수수에서 배유의 증가와 관련된 *qHO6* 유전자좌에서 *DGAT1* 유전자의 469번째에 페닐알라닌 코돈이 삽입되었을 때 배유와 올레산이 증가함을 보였다. 원래 이 위치의 페닐알라닌은 모든 식물의 *DGAT1*에서 잘 보존된 부분인데 옥수수 inbred line에서는 이 부분의 결실

이 자주 발견된다 (Zheng et al. 2008). 이는 *DGAT1* 활성의 증가 또는 발현양의 증가가 종자유 함량 증진에 영향을 미치며 *DGAT1*은 다중불포화지방산보다는 18:1에 대한 선택성이 높음을 보여준다.

DGAT 외에도 TAG 생합성에 관여하는 효소인 PDAT의 유전자도 피마자와 크레피스의 미숙종자에서 처음으로 클로닝되었다 (Dahlqvist et al. 2000). 미숙종자에서 PC의 *sn-2*에 결합된 특이지방산을 acyl-CoA 단계를 거치지 않고 직접 TAG로 전환하기 때문에 특이지방산을 생산하는 형질전환 식물에서 그 비율을 높이는 데에 매우 유용한 효소로 생각된다 (Banas et al. 2000). 피마자에서도 *DGAT2*와 같이 리시놀레인산의 비율을 높여주는 *PDAT1-2*는 리시놀레인산을 포함한 hydroxy fatty acid의 비율을 합성유전자 형질전환체의 17%에서 26% 수준까지 끌어올렸다 (van Erp et al. 2011; Kim et al. 2011). 그러나 DGAT과는 달리 PDAT 형질전환식물에서 종자지방산의 함량 증진이 보고된 바는 없어 PDAT은 DGAT과 같은 기능을 갖고 있지만 특이지방산의 경우를 제외하고는 종자지방산의 함량 증진과 지방산 조성을 조절하는 데에는 주요 역할을 수행하는 것 같지는 않다 (Banas et al. 2000; Mhaske et al. 2005).

Phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase (PDCT)는 DAG를 PC로 전환하고 불포화된 PC를 다시 DAG로 전환하는 정역반응이 가능한 효소이다 (Fig. 1, Slack et al. 1983; Vogel and Browse 1996). 이 효소 유전자가 돌연변이된 *rod1 (reduced oleate desaturation1)* 애기장대는 DAG가 PC로 전환하는 데에 어려움을 겪기 때문에 생성된 TAG의 불포화도가 낮다 (Lu et al. 2009). 아직 보고된 지 얼마되지 않아 판단하기는 이르지만 돌연변이체의 종자지방산이 감소되었다는 보고가 없었던 것으로 보아 이 효소는 지방산 조성에는 관여하지만 종자지방산 함량에는 관여하지는 않는 것 같아 보인다. 또한 지방산 조성과 관련해서 특이지방산의 축적비율을 늘리는 데에 관여하지 않을까 예상하고 있다.

Acyl-CoA binding protein (ACBP)은 세포질에서 acyl-CoA와 결합하여 acyl-CoA를 안정화하고 이동하는 데에 도움을 주며 acyl-CoA가 세포막에 악영향을 주는 것을 막는다고 예상된다. 그중 가장 중요한 역할은 acyl-CoA와 관련된 효소반응이 효율적으로 되도록 조절하는 것이다 (Yurchenko and Weselake 2011). ACBP는 애기장대에서 6개가 동정되었으며 (Xiao and Chye 2009) 이 중 세포질에 위치하고 미숙종자에서 가장 많이 발현되는 것은 ACBP6이다. 이것은 lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT)의 활성을 높여주었고 18:1-CoA보다는 18:2-CoA와 더 친화성이 높았다(Yurchenko et al. 2009). 이것은 PC에서 불포화된 18:2가 LPCAT에 의해 18:2-CoA로 acyl-CoA pool에 들어오게 될 때에 결합함을 시사한다. 고로 다중불포화

지방산이 포함된 TAG 생합성에 관여함을 예상할 수 있다.

배유함량이 높은 옥수수의 경우 종자크기가 줄어들고 농업형질이 나쁜 경향이 있기 때문에 옥수수 종자유 함량을 늘리기 위해 식물의 비특이적 지질수송단백질 (lipid-transfer protein)과 유사한 구조를 갖는 밀의 puroindoline a, b (PINA, PINB)을 옥수수 ubiquitin 프로모터로 전체발현하도록 옥수수에 형질전환한 결과 배 (embryo) 수량과 종자유 함량이 각각 33.8%, 25.2% 증가한 결과를 얻었다 (Zhang et al. 2010).

지질과 다른 대사산물간의 탄소분배 조절을 통한 종자지방산 함량 증진

식물의 종자가 가장 많이 포함하는 것은 1차 대사산물인 탄수화물, 단백질, 지질이다. 쌀을 비롯한 곡물에는 전분 등의 탄수화물이 상대적으로 많고 대두 등에는 단백질이 상대적으로 많으며 유지작물의 종자에는 지방이 상대적으로 많다. 단순히 생각하면 이 대사산물은 모두 탄소가 주요골격을 이루기 때문에 경쟁적 관계라고 할 수 있지만 하나의 대사산물이 줄어든다고 해서 다른 대사산물이 반드시 증가하는 것은 아니다. 지질과 전분 합성 경로 사이의 생화학적 상호작용에 대해서는 알아야 할 것이 아직 많다. 미토콘드리아 pyruvate dehydrogenase (PDH) 복합체는 pyruvate와 CoA에서 CO₂를 방출하고

acetyl-CoA를 합성하여 해당과정과 TCA 회로를 연결한다 (Fig. 2). 미토콘드리아 PDH kinase (PDHK)는 미토콘드리아 PDH를 인산화하여 down-regulation 한다 (Fig. 2). 애기장대에서 종자특이적으로 미토콘드리아 PDHK 유전자 발현을 antisense로 억제했을 때 종자무게와 종자유 함량이 13~20% 증진된 결과를 얻었다 (Zou et al. 1999, Marillia et al. 2003). 미토콘드리아에서 acetyl-CoA의 가수분해 산물인 acetate가 색소체로 이동하여 acetyl-CoA로 재전환되는 것이라는 가설을 제시했고 이 형질전환 애기장대의 종자에서 동위원소로 표지된 대사물질의 분석 결과는 이 가설을 지지했다 (Fig. 2; Marillia et al. 2003).

Pyruvate kinase는 phosphoenolpyruvate (PEP)와 ADP를 pyruvate와 ATP로 전환하는 효소이다 (Fig. 2). Plastid의 pyruvate kinase 유전자 돌연변이가 애기장대는 배 신장이 지연되었고 종자유는 50~70% 감소를 초래했다 (Baud et al. 2007a). 이와 비슷하게 애기장대에서 색소체의 heteromeric pyruvate kinase의 β1 subunit 유전자 돌연변이가 계통에서 종자유 함량이 60% 감소한 결과를 얻었다 (Andre et al. 2007). 이 두 결과는 색소체의 pyruvate kinase는 지방산 생합성 경로에서 전구체 생산에 매우 중요한 효소임을 보여준다.

산화적 5탄당 인산 회로 (Oxidative pentose phosphate pathway)에서 세포질의 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)는 glucose-6-phosphate (G6P)와 NADP⁺를 D-glucono-1,5-lactone 6-phosphate와 NADPH로 전환하는 효소이다

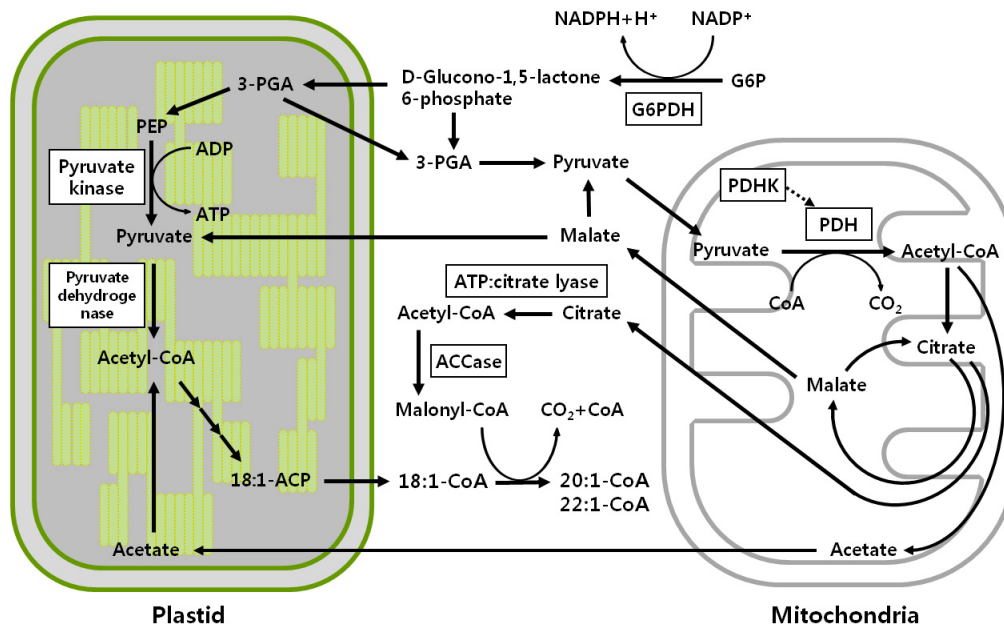


Fig. 2 Carbon flow into lipid biosynthesis in seed. G6P (glucose-6-phosphate) is converted to two pyruvate by several enzymes including G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) and pyruvate kinase. PDH (pyruvate dehydrogenase) catalyzes the formation of acetyl-CoA from pyruvate in both plastid and mitochondria. Acetyl-CoA is hydrolyzed to acetate in mitochondria, and that moves into plastid and reconverts to acetyl-CoA. Fatty acid is made from acetyl-CoA through many steps in plastid. Acetyl-CoA in cytosol is elongated to malonyl-CoA by cytosolic ACCase (acetyl-CoA carboxylase) and malonyl-CoA is used fatty acid elongation. Dashed arrow indicates down-regulation. PDHK: pyruvate dehydrogenase kinase, PEP: phosphoenolpyruvate, 3-PGA: 3-phosphoglycerate

(Fig. 2). 이 세포질 G6PDH는 광합성이 제한적인 종자 발달시 지방산 생합성을 위한 에너지를 공급하는 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 애기장대에서 세포질 G6PDH는 2개 있는데 *g6pdh* 돌연변이들은 지방산 생합성을 위한 NADPH 공급의 감소보다는 지방산 생합성을 위한 기질이 증가하였으며 특히 세포질 *g6pdh* 이중돌연변이는 종자무게와 종자유 함량이 각각 11%, 9% 증가하였다 (Wakao et al. 2008).

전사인자 조절을 통한 종자지방산 함량 증진

앞에서 열거했듯이 지방산 합성에 관련된 유전자를 과발현하거나 지방 외의 다른 물질로 탄소가 공급되는 것을 조절하여 종자유 함량을 높이고자 한 것과는 달리 종자의 발달에 관여하는 전사인자 (Transcription factor, TF)를 과발현한다면 여러 유전자를 동시에 과발현할 필요 없이 효과적으로 종자크기 뿐만 아니라 종자지방산 함량도 높여줄 것으로 예상된다. 종자 성숙을 조절하는 TF에 대한 연구는 애기장대에서 TF 돌연변이와 과발현 연구가 수행되었고 이는 세포의 대사에서 TF의 역할을 탐색하는 데에 사용되어 왔다 (Zhang 2003). 그 중 특히 종

자성숙에 관여하는 TF인 LEAFY COTYLEDON 1, 2 (*LEC1*, 2)와 *FUSCA 3* (*FUS3*), *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (*ABI3*) 등은 서로 다른 TF의 작용을 조절하며 지방생산에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 3; Santos Mendoza et al. 2008). *LEC1*과 *LEC2*는 *FUS3*와 *ABI3*를 up-regulation 하는 것으로 보이며 (To et al. 2006, Wang et al. 2007a), *FUS3*와 *ABI3*는 지속적인 발현을 위해 스스로를 up-regulation 한다 (To et al. 2006). *PICKLE* (*PKL*)은 발아시기에 *LEC1*, *LEC2*, *FUS3*를 억제하는 TF이다 (Ogas et al. 1999, Rider et al. 2003). 그래서 *PKL*은 종자가 유묘로 성장될 때 *LEC1*과 *LEC2* 유전자의 주된 억제조절자로 작용할 것이라고 추측된다 (Rider et al. 2003). *pk1* 돌연변이의 뿌리에서 종자유와 지방산 조성이 비슷한 TAG가 축적되었고 *LEC1*과 *LEC2* 유전자의 mRNA가 100배 이상 증가하였다 (Rider et al. 2003, Rider et al. 2004). Gao 등 (2009)은 애기장대 6b-interacting protein 1-like 1 (*ASIL1*)이 종자성숙 유전자의 발현을 억제하는 TF라고 보고했다. *ASIL1*은 간접적으로 *LEC1*, *LEC2*, *FUS3*, *ABI3* 유전자의 발현을 억제한다. *asill* 돌연변이 유묘에서는 종자유와 지방산 성분이 비슷한 TAG와 2S 알부민 단백질이 축적되었다.

종자유 축적에만 특이적으로 관여하는 *WRI1* 전사유

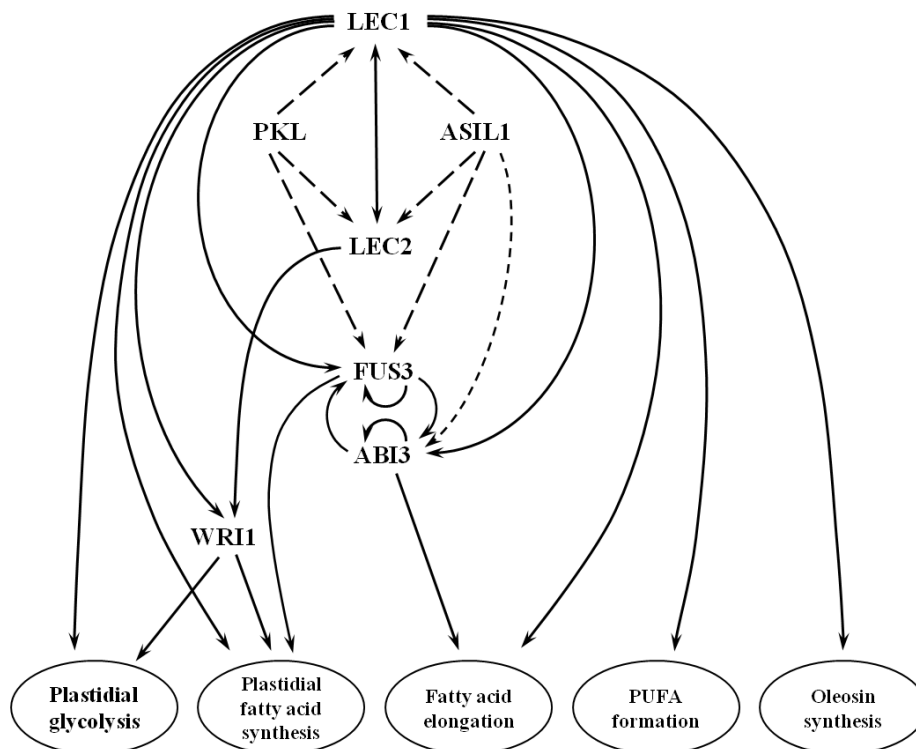


Fig. 3 Effect of transcription factors (TFs) on TAG biosynthesis and their interactions during seed maturation in Arabidopsis. Solid lines and dashed lines indicate up-regulation and down-regulation, respectively. LEAFY COTYLEDON (*LEC*) 1 and *LEC2* up-regulate each other. *PICKLE* (*PKL*) suppress *LEC1*, *LEC2* and *FUSCA3* (*FUS3*). Arabidopsis 6b-interacting protein 1-like 1 (*ASIL1*) may indirectly repress *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* and *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3* (*ABI3*). *ABI3* and *FUS3* up-regulate themselves and each other. *WRI1* up-regulated by *LEC1* and *LEC2* plays a critical role in fatty acid biosynthesis. FA: fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acid

전자가 발견되었다. *wrinkled1* (*wri1*) 돌연변이 애기장대는 종자유 함량이 80%나 줄어들었다 (Focks and Benning 1998). WRINKLED1 유전자 돌연변이인 *wri1* 종자는 종자유 함량이 크게 줄어들어 종자크기도 줄어들면서 종자에 주름이 졌기 때문에 이름지어졌다. 이 돌연변이에서는 수많은 해당계의 효소 활성이 줄어들어서 탄수화물 대사의 조절이 영향을 받는다. 야생형과 *wri1* 돌연변이의 전사체 (transcriptome)의 마이크로어레이 비교 분석을 통해 미숙종자에서 WRI1이 종자유 축적을 조절하는 TF라는 것이 밝혀졌다 (Ruuska et al. 2002). 그리고 WRI1을 조절하는 상위 전사조절인자가 LEC2임이 밝혀졌다 (Baud et al. 2007b).

Mu 등 (2008)은 *LEC1*을 애기장대에서 estradiol 호르몬 유도성인 XVE 프로모터로 과발현하였을 때에 색소체의 지방산 생합성 관련 유전자의 약 60%가 up-regulation됨을 보고하였다. Estradiol이 든 배지에서 자란 형질전환 유묘는 야생형 유묘에서보다 지방산 함량이 4.7배 높았으며 지방산 생합성을 조절하는 데에 *LEC1*이 부분적으로 ABI3, FUS3, WRI3에 의존적이라는 것을 유전적 분석으로 알게 되었다. 또한 애기장대 *LEC1*의 상동유전자 (orthologue)인 유채의 *BnLEC1* 또는 *BnLIL*을 애기장대에 형질전환하였을 때에 *LEC1* 형질전환 애기장대의 경우와 유사한 지방산 함량 증가 및 지방산 생합성 관련 유전자의 up-regulation 등을 보여주었다. Tan 등 (2011)은 이 *LEC1* 과발현 형질전환 식물들이 심하게 비정상적인 발달을 보여주었기 때문에 유채의 종자에서 특이적으로 발현되도록 하였을 때에 2~20%의 종자유 함량이 증가함을 보고했다. Shen 등 (2010)은 옥수수 *LEC1*을 옥수수 종자에서 과발현하여 종자유 함량이 최대 48% 증가하였지만 종자 발아율과 잎 성장이 줄어든 결과를 얻었다. 그래서 옥수수 *WR11*을 동정하여 옥수수 종자에 과발현시킨 결과 야생형 옥수수에 비해 발아율과 성장, 수확량의 차이는 없이 *LEC1* 옥수수와 유사한 비율로 종자유 함량만 증가한 결과를 얻었다.

pkl 돌연변이에서 종자 외의 영양조직에서 종자 지방산 조성을 가진 TAG가 축적되는 결과를 보여주었듯이 *LEC2*와 glucocorticoid receptor (GR)를 융합하여 dexamethasone (DEX)에 의해 활성화되도록 하여 형질전환한 애기장대 잎에서 종자에서만 축적되는 20:1 지방산을 가진 TAG가 축적되는 결과를 보여주었다 (Santos Mendoza et al. 2005). Slocombe 등 (2009)은 노화될 때에 지방산 분해가 되지 않는 퍼옥시좀의 ABC-transporter인 *CTS* 유전자 돌연변이인 애기장대의 잎에서 TAG 양이 야생형인 대조구에 비교하여 10배 이상임을 알 수 있었다. 이 *CTS* 돌연변이체와 DEX 유도성 *LEC2:GR* 형질전환 애기장대와 인공교배하여 노화되는 잎에서 TAG가 건물중의 최대 2%까지 차지하는 결과를 얻었다. 이 실험결과를 통해 만

약 거대역새나 피 등에서 이런 결과를 얻는다면 잎에서 0.6~2 ton/ha의 기름을 얻을 수 있을 것이라고 전망했다. Wang 등 (2007a)은 DEX 유도성 FUS3를 형질전환한 애기장대의 전사체를 분석하였더니 FUS3와 함께 지방산 생합성 유전자의 전사물 (transcripts)이 대량으로 증가한 것을 밝혀냈고 이는 FUS3가 종자유 축적을 조절하는 데에 중심적인 역할을 함을 시사한다.

Dof (DNA binding with one finger)-type 전사인자도 종자유 축적에 역할을 하는 것으로 보인다 (Wang et al. 2007b). Dof는 하나의 C2C2-type zinc-finger-like motif를 포함하는 DNA binding domain을 갖기 때문에 붙여진 이름이다. 대두의 Dof인 GmDof4와 GmDof11을 애기장대에서 과발현한 결과 ACCase β -subunit와 long-chain acyl-CoA synthetase (LACS)의 프로모터 부분의 *cis*-element와 상호 작용하여 이들 유전자의 발현이 증가한 반면 12S 저장단백질 유전자인 CRA1의 발현은 감소하였으며, GmDof4 또는 GmDof11의 발현양이 가장 높은 형질전환 계통에서 종자유 함량이 11~24% 증가했다.

전 망

유지작물의 모델식물인 애기장대를 이용한 식물 지질대사에 대한 연구가 활발해지면서 식물 종자유 축적에 관여하는 주요 대사과정이 밝혀지고 있지만, 이들 대사과정 중 어떤 유전자들이 식물발달과 성장에 부정적 영향을 주지 않고, 종자유 양의 증가에 유용한지 아직 모르는 것이 많다. 식물 종자유 축적은 지방산 합성만을 고려한다면 비교적 단순해보이지만 종자발달시 복잡한 탄소대사에 관여하는 유전자가 많이 있기 때문에 지질 합성에 관여하는 효소 유전자 하나의 과발현이 모두 종자유 함량의 큰 증가를 이끌어내지는 못하였다. 그러나 특정 종류의 지방산이나 특이지방산의 비율을 높여주는 데에 관여하는 효소는 그 나름의 가치를 지니고 있다. 이들 유전자의 발현을 높여주거나 억제하여 특정 지방산이나 특이지방산을 더 많이 생산할 수도 있을 것이다. 그리고 단지 지방산 합성에 관여하는 하나의 유전자를 과발현했을 때보다는 여러 탄소 대사에 관여하는 유전자를 동시에 발현하는 것이 더욱 효과적인 것으로 생각된다. 그러나 이는 복잡한 대사과정을 동시에 조절해야 하는 쉽지 않은 작업이기 때문에 종자발달에 관여하는 전사인자 (TF)의 과발현을 통해 해결하고자 하는 연구도 최근에 진행중인데 이는 꽤 효과적인 것으로 보이나, 식물생장의 저해 등의 부작용도 있어 그 문제를 해결하는 방법이 필요하다. 또한 실험실에서 나온 결과는 포장에서 진행한 실험과는 다른 결과를 보이는 경우가 많아 포장실험결과까지 보아야 할 것이다. 현재까지 나온 결과

만으로 볼 때 목적유전자와 적절한 TF을 동시에 발현하는 것이 종자유 함량 증진에 효과적일 것으로 예상된다. 앞으로 이 연구에 더욱 발전된 연구결과가 나올 것으로 기대되며, 생명공학에 의한 대두, 유채, 옥수수 등의 주요 종자유 생산량은 더욱 늘어날 것으로 사료된다.

적 요

식물유의 거의 대부분은 triacylglycerol (TAG) 형태로 종자에 축적되어있으며 이는 종자가 발아할 때에 필수적인 에너지공급원이자 동물과 인간들에게 필수지방산과 중요한 에너지원이다. 최근 식용유의 건강기능성으로 수요증가와 더불어 바이오디젤과 산업원료 등의 산업적 수요도 증가함에 따라 더욱 중요한 자원이 되고 있다. 그래서 생명공학기술로 종자유 함량을 증진하고자 하면 지질 생합성에 탄소의 유입에 관여하는 조절 유전자를 과발현 또는 억제하는 것이 결정적으로 중요하다. 본 총설에서는 지질함량에 영향을 미치는 것으로 여겨지는 후보 유전자들에 대해 기술하고 이들의 지방 함량 증대 가능성을 조사하였다. 식물의 지방산의 생합성과 종자유 축적에 관여하는 유전자들은 크게 구분하자면 첫째, TAG가 생합성되기 위해 필요한 전구체를 합성하는 유전자, 둘째, 지방산합성과 TAG 축적에 관여하는 유전자, 셋째, 종자 발달과 종자유 축적에 관여하는 전사인자 유전자가 있다. 종자유 함량을 결정하는 대사들은 앞에서 언급했듯이 매우 복잡하기 때문에 최근에 전사인자의 조절이 다수의 지방생산 대사 유전자를 동시 조작하여 형질전환 식물에서 종자유 함량이 증진하는 것보다 더 바람직한 접근법으로 여겨지고 있다. 그러나 전사조절유전자의 과발현에 의해 나쁜 농업형질의 유도 같은 문제점도 해결해야 한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 기관고유 과제 (과제번호 PJ006715)와 차세대 바이오그린21사업, 시스템합성농생명공학사업단 과제 (과제번호 PJ008102)의 연구비지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

Andre C, Froehlich JE, Moll MR, Benning C (2007) A heteromeric plastidic pyruvate kinase complex involved in seed oil biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:2006-2022.

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.
- Baud S, Wuillème S, Dubreucq B, de Almeida A, Vuagnat C, Lepiniec L, Miquel M, Rochat C (2007a) Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 52:405-419.
- Baud S, Santos Mendoza M, To A, Harsoët E, Lepiniec L, Dubreucq B (2007b) WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. *Plant J* 50:825-838.
- 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.
- Broun P, Somerville C (1997) Accumulation of ricinoleic, lesquerolic, and densipolic acids in seeds of transgenic *Arabidopsis* plants that express a fatty acyl hydroxylase cDNA from castor bean. *Plant Physiol* 113:933-942.
- 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.
- 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.
- van Erp H, Bates PD, Burgal J, Shockey J, Browse J (2011) Castor Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase Facilitates Efficient Metabolism of Hydroxy Fatty Acids in Transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155:683-693.
- Focks N, Benning C (1998) *wrinkled1*: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* 118:91-101.
- Gao M-J, Lydiate DJ, Li X, Lui H, Gjetvaj B, Hegedus DD, Rozwadowski K (2009) Repression of seed maturation genes by a trihelix transcriptional repressor in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 21:54-71.
- He X, Turner C, Chen GQ, Lin JT, McKeon TA (2004a) Cloning and characterization of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from castor bean. *Lipids* 39:311-318.
- He X, Chen GQ, Lin JT, McKeon TA (2004b) Regulation of diacylglycerol acyltransferase in developing seeds of castor. *Lipids* 39:865-871.
- 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, ReedDW, 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.
- 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.
- Kim HU, Lee K-R, Go YS, Jung JH, Suh M-C, Kim JB (2011) Endoplasmic Reticulum-Located PDAT1-2 from Castor Bean Enhances Hydroxy Fatty Acid Accumulation in Transgenic Plants. *Plant Cell Physiol*. 52:983–993.
- 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.
- Kroon JT, Wei W, Simon WJ, Slabas AR (2006) Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals. *Phytochemistry* 67:2541–2549.
- 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.
- Lu C, Xin Z, Ren Z, Miquel M, Browse J (2009) An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *RODI* 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.
- Maisonneuve S, Bessoule J-J, Lessire R, Delseny M, Roscoe TJ (2010) Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152:670–684.
- Marillia E-F, Micallef BJ, Micallef M, Weninger A, Pedersen KK, Zou J, Taylor DC (2003) Biochemical and physiological studies of *Arabidopsis thaliana* transgenic lines with repressed expression of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase. *J Exp Bot* 54:259–270.
- Metzger JO, Bornscheuer U (2006) Lipids as renewable resource: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl Microbiol Biotechnol* 7:13–22.
- Mhaske V, Beldjilali K, Ohlrogge 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.
- Mu J, Tan H, Zheng Q, Fu F, Liang Y, Zhang J, Yang X, Wang T, Chong K, Wang X-J, Zuo J (2008) LEAFY COTYLEDON1 is a key regulator of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148:1042–1054.
- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13839–13844.
- Ohlrogge JB, Browse J (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7:957–970.
- Okuley 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. *Plant Cell* 6:147–158.
- Rider Jr SD, Henderson JT, Jerome RE, Edenberg HJ, Romero-Severson J, Ogas J (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *Plant J* 35:33–43.
- Rider Jr SD, Hemm MR, Hostetler HA, Li H-C, Chapple C, Ogas J (2004) Metabolic profiling of the *Arabidopsis* *pkl* mutant reveals selective derepression of embryonic traits. *Planta* 219:489–499.
- Roesler K, Shintani D, Savage L, Boddupalli S, Ohlrogge J (1997) Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiol* 113:75–81.
- Ruuska SA, Girke T, Benning C, Ohlrogge JB (2002) Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plant Cell* 14:1191–1206.
- Saha S, Enugutti B, Rajakumari S, Rajasekharan RL (2006) Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol* 141:1533–1543.
- Santos Mendoza M, Dubreucq B, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L (2005) LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Lett* 579:4666–4670.
- Santos Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M, Lepiniec L (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant J* 54:608–620.
- Shen B, Allen WB, Zheng P, Li C, Glassman K, Ranch J, Nubei D, Tarczynski MC (2010) Expression of *ZmLECI* and *ZmWR11* increases seed oil production in maize. *Plant Physiol* 153:980–987.
- Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, Kuan JC, Shanoa 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.
- Slack CR, Campbell LC, Browse JA, Roughan PG (1983) Some evidence for the reversibility of cholinephosphotransferase-catalyzed reaction in developing linseed cotyledons in vivo. *Biochim Biophys Acta* 754:10–20.
- Slocombe SP, Cornah J, Pinfield-Wells H, Soady K, Zhang Q, Gilday A, Dyer JM, Graham IA (2009) Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways. *Plant Biotechnol J* 7:694–703.

- Tan H, Yang X, Zhang F, Zheng X, Qu C, Mu J, Fu F, Li J, Guan R, Zhang H, Wang G, Zuo J (2011) Enhanced seed oil production in canola by conditional expression of *Brassica napus* *LEAFY COTYLEDON1* and *LEC1-like* in developing seeds. *Plant Physiol* 156:1577-1588.
- To A, Valon V, Savino G, Guillemot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F (2006) A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation. *Plant Cell* 18:1642-1651.
- Vigeolas H, Geigenberger P (2004) Increased levels of glycerol-3-phosphate lead to a stimulation of flux into triacylglycerol synthesis after supplying glycerol to developing seeds of *Brassica napus* L. in planta. *Planta* 219:827-835.
- Vigeolas H, Waldeck P, Zank T, Geigenberger P (2007) Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotech J* 5:431-441.
- 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.
- Wakao S, Andre C, Benning C (2008) Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146:277-288.
- Wang H, Guo J, Lambert KN, Lin Y (2007a) Developmental control of Arabidopsis seed oil biosynthesis. *Planta* 226:773-783.
- Wang H-W, Zhang B, Hao YJ, Huang J, Tian AG, Liao Y, Zhang J-S, Chen S-Y (2007b) The soybean Dof-type transcription factor genes, *GmDof4* and *GmDof11*, enhance lipid content in the seeds of transgenic Arabidopsis plants. *Plant J* 52:716-729.
- Xiao S and Chye M (2009) An Arabidopsis family of six acyl-CoA-binding proteins has three cytosolic members. *Plant Physiol Biochem* 47:479-484.
- Xu J, Francis T, Mietkiewska E, Giblin EM, Barton DL, Zhang Y, Zhang M, Taylor DC (2008) Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent *diacylglycerol acyltransferase 1* (*DGAT1*) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content. *Plant Biotech J* 6:799-818.
- Yurchenko OP, Nykiforuk CL, Moloney MM, Ståhl U, Banaś A, Szymne S, Weselake RJ (2009) A 10-kDa acyl-CoA-binding protein (ACBP) from *Brassica napus* enhances acyl exchange between acyl-CoA and phosphatidylcholine. *Plant Biotech J* 7:602-610.
- Yurchenko OP, Weselake RJ (2011) Involvement of low molecular mass soluble acyl-CoA-binding protein in seed oil biosynthesis. *New Biotechnol* 28:97-109.
- Zhang ZZ (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 6:430-440.
- Zhang J, Martin JM, Beecher B, Lu C, Hannah LC, Wall ML, Altosaar I, Giroux MJ (2010) The ectopic expression of the wheat puroindoline genes increase germ size and seed oil content in transgenic corn. *Plant Mol Biol* 74:353-365.
- 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 G-Y, 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, Wei Y, Jako C, Kumar A, Selvaraj G, Taylor DC (1999) The *Arabidopsis thaliana TAG1* mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J* 19:645-653.
- 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 *Brassicaceae* by expression of a yeast *sn-2* acyltransferase gene. *Plant Cell* 9:909-923.
- Zou J, Qi Q, Katavic V, Marillia E-F, Taylor DC (1999) Effects of antisense repression of an *Arabidopsis thaliana* pyruvate dehydrogenase kinase cDNA on plant development. *Plant Mol Biol* 41:837-849.