카멜리나 (*Camelina sativa* L. cv. CAME)로부터 3 *microsomal delta-12 fatty acid desaturase* 유전자들의 분리 및 기능 분석

김효진 · 고영삼 · 김용휘 · 이상협 · 김경남 · 이금주 · 김기준 · 서미정

Isolation and functional analysis of three *microsomal delta-12 fatty acid desaturase* genes from *Camelina sativa* (L.) cv. CAME

Hyojin Kim · Young Sam Go · Augustine Yonghwi Kim · Sanghyeob Lee · Kyung-Nam Kim · Geung-Joo Lee · Gi-Jun Kim · Mi Chung Suh

Received: 2 September 2014 / Revised: 15 September 2014 / Accepted: 22 September 2014

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Camelina sativa* that belongs to Brassicaceae family is an emerging oilseed crop. Camelina seeds contain approximately 40% storage oils per seed dry weight, which are useful for human and animal diets and industrial applications. Microsomal delta-12 fatty acid desaturase2 (FAD2) catalyzes the conversion of oleic acid to linoleic acid. The polymorphisms of FAD2 genes are correlated with the levels of oleic acids in seed oils. Microsomal delta-12

fatty acid desaturase2 (FAD2) catalyzes the conversion of oleic acid to linoleic acid. The polymorphisms of FAD2 genes are correlated with the levels of oleic acids in seed oils. In this study, three *CsFAD2* genes (*CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* and *CsFAD2-3.1*) were isolated from developing seeds of *Camelina sativa* (L.) cv. CAME. The nucleotide and deduced amino acid sequences of three *CsFAD2* genes were compared with those from dicotyledon and monocotyledon plants including Camelina cultivars Sunesone and SRS933. Three histidine motifs (HECGH, HRRHH, and HVAHH) required for FAD activity and a hydrophobic valine or isoleucine residue, which is a SNP (single nucleotide polymorphism) marker related with enzyme activity are well conserved in three *CsFAD2*s. The expressions of *CsFAD2-1* and *CsFAD2-3.1* were ubiquitously detected in various Camelina organs, whereas the *CsFAD2-2* transcripts were predominantly detected in flowers and developing seeds. The contents of oleic acids decreased, whereas the amounts of linoleic acid increased in dry seeds of transgenic *fad2-2* lines expressing each *CsFAD2* gene compared with *fad2-2* mutant, indicating that three *CsFAD2* genes are functionally active. The isolated *CsFAD2* genes might be applicable in metabolic engineering of storage oils with high oleic acids in oilseed crops.

H. Kim · Y. S. Go · M. C. Suh (✉)
전남대학교 농업생명과학대학 바이오에너지공학과
(Department of Bioenergy Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju, Korea)
e-mail: mcsuh@chonnam.ac.kr

A. Y. Kim
세종대학교 생명과학대학 식품공학부
(Department of Food Science & Technology, Sejong University, Seoul, Korea)

S. Lee
세종대학교 생명과학대학 바이오자원공학과
(Department of Bioresource engineering, Sejong University, Seoul, Korea)

K.-N. Kim
세종대학교 생명과학대학 분자생물학과
(Department of Molecular Biology, Sejong University, Seoul, Korea)

G.-J. Lee
충남대학교 농업생명과학대학 원예학과
(Department of Horticultural Science, Chungnam National University, Daejeon, Korea)

G.-J. Kim
아시아종묘(주)
(Breeding Institute, Asia Seed Co. Ltd., Icheon, Gyeonggi, Korea)

서론

카멜리나(*Camelina sativa*)는 겨자(*Brassica juncea*), 크램비

(*Crambe hispanica*), 배추(*Brassica rapa*), 유채(*Brassica napus*) 그리고 양배추(*Brassica oleracea*) 등이 포함된 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 작물이다. 카멜리나는 생육기간이 짧고(80~100일), 가뭄 저항성 및 진균균에 속하는 *Leptosphaeria maculans*와 *Alternaria brassicae* 병원균에 의한 흑반병과 검은무늬병에 대한 저항성을 가지고 있으며(Putnam et al. 1993; Moser 2010), 유럽, 중앙아시아, 캐나다 그리고 미국 등 넓은 지역에서 재배가 가능한 작물이다(Budin et al. 1995). 종자 무게의 36~47% 비율로 존재하는 카멜리나 종자 오일은 인간과 동물의 주된 에너지원으로 사용될 수 있고, 특히 카멜리나 종자 오일의 80%를 차지하는 불포화 지방산(unsaturated fatty acid)은 포화 지방산(saturated fatty acid)보다 냉점이 낮아 제트 연료, 바이오디젤 그리고 비누등의 산업적 응용에 적합하다는 장점을 가지고 있다(Moser 2012; Waraich et al. 2013).

식물의 종자 오일을 형성하는 기본 성분은 엽록체에서 합성된다. 합성된 탄소 수 16개와 18개 길이의 지방산은 세포질로 방출되면 소포체에 존재하는 acyltransferase 효소들(glycerol-3-phosphate acyltransferase, lysophosphatidic acid acyltransferase, acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase, phospholipid: diacylglycerol acyltransferase)에 의해 글리세롤의 sn-1, sn-2 그리고 sn-3 위치에 결합하여 triacylglycerol (TAG) 형태를 이룬다(Gimeno and Cao 2008; Kennedy 1961; Kim et al. 2005; Zhang et al. 2009; Zou et al. 1999). 특히 카멜리나 종자 오일에는 palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2), linolenic acid (18:3), eicosenoic acid (20:1) 그리고 erucic acid (22:1)가 약 7%, 3%, 7%, 14%, 41%, 13% 그리고 5% 비율로 존재한다(Rodríguez-Rodríguez et al. 2013). 그 중에서 linoleic acid는 microsomal delta-12 fatty acid desaturase2 (FAD2) 효소에 의해 phosphatidyl choline (PC)에 존재하는 oleic acid의 12번째와 13번째 탄소 사이에 이중 수소결합이 형성되어 합성된다(Shanklin and Cahoon 1998). 이러한 FAD2의 기능은 애기장대 *fad2* 돌연변이체 종자에서 linoleic acid의 함량은 감소하고 oleic acid의 함량은 증가하는 표현형으로 처음 확인되었으며(Lemieux et al. 1990; Okuley et al. 1994), 그 후 십자화과에 속한 배추, 유채, 크램비, *Physaria fendleri*, 카멜리나 뿐 아니라 땅콩(*Arachis hypogaea*), 유동나무(*Vernicia fordii*), 기름밤나무(*Xanthoceras sorbifolia*), 참깨(*Sesamum indicum*), 포도(*Vitis labrusca*), 홍화(*Carthamus tinctorius*), 크레피스(*Crepis alpine*), 콩(*Glycine max*) 그리고 자트로파(*Jatropha curcas*) 등으로부터 FAD2 유전자들이 클로닝되었다(Cheng et al. 2013; Chi et al. 2011; Dyer et al. 2002; Guo et al. 2013; Jung et al. 2011; Kang et al. 2011; Kim et al. 2006; Lee et al. 2012; 2013; Liu et al. 2013; Lozinsky et al. 2014; Nam and Kappock 2007; Pham et al. 2010; Qu et al. 2012).

FAD2 효소를 암호화하는 유전자들의 수와 그들의 발현

양상은 다양한 식물에서 보고되었다. 애기장대의 경우 1개의 *AtFAD2*가 식물 전 조직에 걸쳐 발현되고(Lemieux et al. 1990; Miquel et al. 1993), 참깨는 현재까지 1개의 *SiFAD2* (*SeFAD2*) 유전자가 보고되었는데, 발달하는 종자에서 강하게 발현될 뿐만 아니라 잎, 꽃 그리고 유묘에서도 *SiFAD2* (*SeFAD2*) 발현이 관찰되었다(Kim et al. 2006). 배추는 2개의 FAD2 유전자들이 확인되었고, 기능을 가지는 *BrFAD2-1* 유전자는 배추의 발달하는 전 조직에서 발현이 강한 반면, *BrFAD2-2* 유전자는 아미노산 합성이 조기 종결되는 염기서열을 가지고 있었다(Jung et al. 2011). 또한, 2개의 FAD2를 가지는 포도의 경우, *VIFAD2-1* 유전자는 전 조직에 걸쳐 발현을 보이는 반면, *VIFAD2-2* 유전자는 발달하는 종자에서 강하게 발현하였다(Lee et al. 2012). 4개의 유채 FAD2 경우에는 아미노산 합성이 조기 종결되는 염기서열을 가지는 *BnFAD2-3*를 제외한 *BnFAD2-1*과 *BnFAD2-2*는 전 조직에서 발현하였고, *BnFAD2-4* 유전자는 발달하는 종자에서 강한 발현이 확인되었다(Lee et al. 2013).

애기장대의 계통에는 SNPs (single nucleotide polymorphisms)와 indels (insertion/deletion)등의 총 56,670개의 다형성(polymorphism)을 가지고 있고(Rounsley and Last 2010), 이러한 polymorphism이 애기장대의 ecotype별 차이에 영향을 미친다고 알려져 있다(Le Corre et al. 2002; Vander Zwan et al. 2000). 옥수수에서도 polymorphism이 보고되었는데, 2개의 inbred line (PH09B와 ASKC28IB1)에서는 *DGAT1* 대립유전자의 아미노산 서열은 1개의 특정 아미노산 잔기 phenylalanine (F469)의 삽입(insertion)이 종자 내 오일의 함량을 결정지을 수 있다는 것을 확인하였다(Zheng et al. 2008). 그리고 또 다른 옥수수 2개의 inbred line (PH1B5와 PH09B)의 FAD2 대립유전자의 아미노산 서열을 살펴보면, SNP에 의해 아미노산의 화학적 성질이 다른 계열(non-synonymous) 그리고 같은 계열(synonymous)간의 차이가 관찰되었는데, 이러한 차이에 의해 종자에 low-oleic acid 혹은 high-oleic acid를 가지는 표현형이 결정될 수 있다고 제시하였다(Beló et al. 2008).

최근 카멜리나 품종 Suneson으로부터 3개의 FAD2 유전자들(*CsFAD2-1/CsFAD2C*, *CsFAD2-2/CsFAD2A* 그리고 *CsFAD2-3/CsFAD2B*)이 클로닝 되었는데(Hutcheon et al. 2010; Kang et al. 2011), 이 유전자들이 도입된 효모에서는 linoleic acid가 합성되었고, antisense RNA 기술을 도입하여 3개의 *CsFAD2* 유전자들의 발현이 모두 억제된 카멜리나 형질 전환 식물체에서는 linoleic acid의 함량이 약 10% 비율로 감소하는 반면 oleic acid의 함량이 약 33% 비율로 증가하였다(Kang et al. 2011). 한편, 카멜리나 품종 SRS933의 계통 염기서열 데이터베이스에서도 3개의 FAD2 유전자들이 발견되었으나(Kagale et al. 2014; *Camelina sativa* Genome Project; <http://www.camelinadb.ca/>), 현재까지 실험적인 연

구는 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 카멜리나 품종 CAME의 종자로부터 3개의 *FAD2* 유전자들을 분리하였고, 이들과 기존에 보고된 카멜리나, 십자화과 및 다른 식물 종으로부터 분리된 *FAD2*와의 염기 및 아미노산 서열을 비교 분석하였다. 카멜리나의 서로 다른 기관별로 각 *FAD2* 유전자들의 발현 양상을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 더불어, 카멜리나 *FAD2* 효소들의 식물에서의 기능을 확인하고자 애기장대 *FAD2* 유전자가 돌연변이된 식물체에 각 유전자들을 도입시켜 발현(heterologous expression)을 유도하였고, 형질 전환 식물체의 종자에서 지방산 함량과 성분을 조사하였다. 이로써 카멜리나 품종 CAME으로부터 클로닝된 3개의 *FAD2*는 모두 oleic acid를 linoleic acid로 전환시킬 수 있는 활성을 가지고 있는 것을 확인하였으며, 이는 작물의 종자오일 성분 변형 연구에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

식물체 배양

카멜리나(*Camelina sativa*, cv. CAME, USDA GRIN seed accession PI 650140), 애기장대 야생형(*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia-0) 그리고 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체가 사용되었다(Lemieux et al. 1990). 카멜리나 및 그 형질 전환 식물체의 종자는 배양실 23°C, 장일 조건(16시간/8시간, 광/암)으로 생육시켰다. 또한 애기장대 및 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체의 종자는 4°C에서 3일 동안 저온 처리 후, 표면소독을 실시하였다. 애기장대 종자는 1% sucrose (w/v)와 0.7% phytoagar (w/v)가 포함된 1/2MS 고체배지에서 발아시켰고, 형질전환된 애기장대 식물체는 carbenicillin과 phosphinothricin (PPT)이 각각 100 µg·mL⁻¹과 8 µg·mL⁻¹의 농도로 포함하는 1/2MS 고체배지에서 선발한 후, 멸균된 흙(상토:질석:펄라이트, 3:2:1)으로 옮겨 생육하였다.

카멜리나 *FAD2* 유전자 클로닝

카멜리나에 존재하는 *FAD2* 유전자의 분리는 계통학적으로 근연관계가 가까운 십자화과 식물인 유채, 배추 그리고 애기장대의 *FAD2* 유전자들의 염기서열의 유사성을 분석하여 *FAD2* coding sequence의 5'-end와 3'-end의 일치하는 염기서열을 이용하여 특이적 프라이머를 제작하였다(Table 1). 카멜리나의 발달하는 종자 RNA는 Oñate-Sánchez와 Vicente-Carbajosa (2008)의 방법을 이용하여 추출하였고, 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 3개의 *CsFAD2* 유전자들이 분리되었다. 분리된 *CsFAD2* 유전자

들은 pGEM-T easy vector (pGEM[®]-T Easy Vector System I Promega)에 삽입한 후 염기서열들을 확인하였다. 애기장대의 *FAD2* 유전자들과 카멜리나의 *FAD2* 유전자들(*CsFAD2-1*, *CsFAD2-2*, *CsFAD2-3*, *Csa15g016000.1* 그리고 *CsFAD2-3.1*)의 염기서열 혹은 그로부터 연역한 아미노산 서열을 CLUSTALW 프로그램을 이용하여 정렬한 후 BOXSHADE 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)을 이용해 유사성 정도를 확인하였다. TMHMM Server, Ver. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/se-rvices/TMHMM/>)을 이용하여 각 유전자의 아미노산 서열에 존재하는 transmembrane domain을 조사하였다. 계통도 분석을 위해 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 데이터베이스로부터 배추(*Brassica rapa*), 유채(*Brassica napus*), 크램비(*Crambe hispanica*), *Physaria fendleri*, 땅콩(*Arachis hypogaea*), 자트로파(*Jatropha curcas*), 크레피스(*Crepis alpine*), 홍화(*Carthamus tinctorius*), 콩(*Glycine max*), 참깨(*Sesamum indicum*), 유동나무(*Vernicia fordii*), 포도(*Vitis labrusca*) 그리고 기름밤나무(*Xanthoceras sorbifolia*) 등으로부터 *FAD2* 아미노산 서열을 확보하여 MEGA 5.05 프로그램으로 CLUSTALW 분석 후 neighbor-joining method를 이용하여 1,000번의 반복 수행을 통해 계통도를 제작하였다.

RT-PCR 분석

장일 조건에서 3주 동안 배양한 카멜리나의 식물체에서 뿌리를 제외한 전 식물체, 5주 동안 배양한 식물체의 잎, 줄기, 개화되지 않은 꽃, 개화된 꽃 그리고 개화 후 10~20 일된 발달하는 종자로부터 RNA를 추출하였다. 발달하는 종자를 제외한 다른 조직들의 RNA는 QIAGEN RNeasy[®] plant mini kit를 이용하여 추출하였고, 발달하는 종자는 Oñate-Sánchez와 Vicente-Carbajosa (2008)의 방법을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 GoScript[™] Reverse Transcription System (Promega)에서 제공하는 방법을 이용하여 cDNA로 전환시킨 다음, RT-PCR에 사용하였다. RT-PCR에 사용된 유전자 특이적 프라이머들은 Kang et al. (2011)을 참고하였으며, cDNA의 질과 양의 비교하기 위해 *CsACTIN11* 유전자를 대조구로 사용하였다(Hutcheon et al. 2010).

Binary vector 제작

박테리아 선발 마커인 Neomycin phosphotransferaseII (NPTII) 유전자와 형질전환 식물체 선발 marker인 Phosphinothricin acetyltransferase (PAT) 유전자를 포함하는 pCAMBIA3300 vector (CAMBIA's BIOS Initiative)를 이용하였다. 식물체 전 조직에서 발현을 유도하는 cauliflower mosaic virus 35S RNA (CaMV35S) 프로모터는 pCAMBIA3300 vector에 HindIII

와 *Bam*H1 제한효소 위치에 그리고 *nopaline synthase* 유전자의 terminator는 *Sac*I과 *Eco*R1 제한효소 위치에 각각 삽입하였다. 그리고 분리된 3개의 *CsFAD2* 유전자들은 *Bam*H1 제한효소를 이용하여 각각 클로닝하였다.

애기장대 형질전환 및 형질전환 식물체 선발

CaMV35S 프로모터 하에서 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1* 유전자가 각각 발현되도록 제작한 binary vector를 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체에 *Agrobacterium*-mediated transformation 방법을 이용하여 유전자를 도입시켰다(Bechtold and Pelletier 1998). 형질전환된 애기장대 종자를 수확한 후, carbenicillin과 PPT가 각각 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 과 $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 농도로 포함된 1/2MS 고체배지에 파종하여 PPT 항생제 저항성에 대한 여부에 따라 형질전환 식물체를 선별하였다. 각각 생존한 식물체의 잎으로부터 DNA extraction buffer (250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 200 mM Tris-pH 8.0)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였고, 유전자 특이적 프라이머들(Table 1) 이용하여 PCR을 수행함으로써 외래 유전자 도입 여부를 확인하였다.

Gas chromatography (GC)를 이용한 지방산 분석

애기장대 야생형, 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체 그리고 *CsFAD2* 유전자가 도입되어 형질전환된 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체의 종자로부터 지방산 분석을 수행하기 위해 각각 100개의 종자가 사용되었다. 유리 튜브에 애기장대 종자와 5% (v/v) sulfuric acid가 포함된 메탄올을 1 mL, toluene 0.5 mL 그리고 표준 시료로 glyceryl triheptadecanoate $50 \mu\text{g}$ 을 첨가하여 95°C 에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 0.9% NaCl (w/v)을 이용하여 글리세롤과 지방산을 분리시켰고, 헥산을 이용하여 fatty acid methyl esters (FAMES)를 추출하였다. 추출된 FAMES은 질소가스를 이용하여 농축시켜, DB-23 column (30 m X 0.25 mm, $25 \mu\text{m}$ film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA., USA)이 장착된 gas chromatograph (GC-2010, Shimadzu, Japan)를 이용해서 분석하였다. Carrier gas는 헬륨($1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)을 사용하였고, split은 1/30 되도록 하였다. 각각의 지방산은 표준 시료의 피크 면적을 비교하여 분석하였다. GC 분석의 온도 조건은 Jung et al.

(2011) 논문을 참조하여 수행하였다.

결 과

카멜리나 (*Camelina sativa* cv. CAME) *FAD2* 유전자들의 분리

카멜리나 품종 CAME의 발달하는 종자 RNA로부터 *FAD2* 단백질을 암호화하는 것으로 추정되는 3개의 유전자를 분리하였고, 각각 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1*로 명명하였다. *CsFAD2-1*와 *CsFAD2-2*의 염기서열은 open reading frame (ORF)이 $1,155\text{bp}$ 이고, *CsFAD2-3.1*은 5'-end로부터 42번째에 'TTC' 염기서열이 더 존재하여 ORF가 $1,158\text{bp}$ 로 이루어져 있음을 확인하였다(Fig. 1A). 클로닝된 카멜리나와 애기장대 *FAD2*의 염기서열을 비교한 결과, *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1*의 염기서열은 각각 93.1%, 93.4% 그리고 93.5% 유사함을 확인하였고(Fig. 1A), 카멜리나 품종 Sunesone과 SRS933들로부터 확인된 *FAD2*과 비교하였을 경우(Kang et al. 2011; *Camelina sativa* Genome Project; <http://www.camelinadb.ca/>), *CsFAD2-1*과 *CsFAD2-2* 유전자는 각각 *CsFAD2-1/Csa19g016350.1*과 *CsFAD2-2/Csa1g013220.1*로 동일한 염기서열을 가지고 있음을 확인하였다. 반면 *CsFAD2-3.1*과 *Csa15g016000.1*의 ORF 염기서열에서는 42번째에 'TTC'가 존재하지만, *CsFAD2-3*에는 다른 *CsFAD2-1*과 *CsFAD2-2*처럼 'TTC' 염기서열이 존재하지 않았다. 또한, *Csa15g016000.1*의 ORF 염기서열의 612번째와 618번째는 각각 'A'와 'T'로 확인되었으나, *CsFAD2-3.1*과 *CsFAD2-3*의 유전자들에는 'G'와 'C'로 존재함을 확인하였다. 그리고 *Csa15g016000.1*의 ORF 염기서열의 897번째 'A'인데 반해 *CsFAD2-3.1*과 *CsFAD2-3*에서는 'T'로 차이를 보였다(Fig. 1B).

카멜리나 *FAD2*들의 염기서열을 바탕으로 번역된 아미노산 서열의 경우 *CsFAD2-1*과 *CsFAD2-2*는 384개, *CsFAD2-3.1*은 385개 아미노산으로 이루어져 있고, 번역된 아미노산 서열의 상동성 분석에서 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1*은 약 96%의 유사성이 확인되었다(Fig. 1C). *CsFAD2-3.1*과 *Csa15g016000.1*의 염기서열의 삽입으로 인해 N-terminus의 15번째 아미노산 serine이 삽입되어 있는

Table 1 Primers used in this study

Reactions	Primers	Sequences (5'-3')	Restriction enzyme sites
Isolation of <i>CsFAD2</i>	CsFAD2-F1	CGGGGATCCATGGGTGCAGGTGGAAGAAT	<i>Bam</i> H1
	CsFAD2-R1	CGGGGATCCCATCATCCTCATAACTTATTGTTGTACC	<i>Bam</i> H1
Complementation	CaMV35SP-F	ATCGTTGAAGATGCCTCTGC	
	CsFAD2-R	ATCTGGAGGCGTTCACGGTCGT	

(A)

CsFAD2-1	1	ATGGGTGACAGTGGAGAAATGCCGTTCTCTTCTTCTTC---CAAGAAATCTGAAACC	CsFAD2-1	598	TGGGCGAGACCATACGTTGGTTCGCTTGCATTTCTTCCCAACGCTCCCATCTACAA
CsFAD2-2	1	ATGGGTGACAGTGGAGAAATGCCGTTCTCTTCTTCTTC---CAAGAAATCTGAAACC	CsFAD2-2	598	TGGGCGAGACCATACGAGGTTGCGTTCGATTTCTTCCCAACGCTCCCATCTACAA
CsFAD2-3.1	1	ATGGGTGACAGTGGAGAAATGCCGTTCTCTTCTTCTTC---CAAGAAATCTGAAACC	CsFAD2-3.1	601	TGGGCGAGACCATACGAGGTTGCGTTCGATTTCTTCCCAACGCTCCCATCTACAA
AtFAD2	1	ATGGGTGACAGTGGAGAAATGCCGTTCTCTTCTTCTTC---CAAGAAATCTGAAACC	AtFAD2	595	TGGGCGAGACCATACGAGGTTGCGTTCGATTTCTTCCCAACGCTCCCATCTACAA
CsFAD2-1	58	GATGCCATAAAGCGTGTGCCCTGCGAGAAACCGGTTCAAGCTGGGAGACTGAAGAAA	CsFAD2-1	658	GACCGTGAAGCGCTCCAGATATATCTCTGTATGCCGATTTCTAGCAGTCTGTTTGGG
CsFAD2-2	58	GATGCCATAAAGCGTGTGCCCTGCGAGAAACCGGTTCAAGCTGGGAGACTGAAGAAA	CsFAD2-2	658	GACCGTGAAGCGCTCCAGATATATCTCTGTATGCCGATTTCTAGCAGTCTGTTTGGG
CsFAD2-3.1	61	GATGCCATAAAGCGTGTGCCCTGCGAGAAACCGGTTCAAGCTGGGAGACTGAAGAAA	CsFAD2-3.1	661	GACCGTGAAGCGCTCCAGATATATCTCTGTATGCCGATTTCTAGCAGTCTGTTTGGG
AtFAD2	55	GATGCCATAAAGCGTGTGCCCTGCGAGAAACCGGTTCAAGCTGGGAGACTGAAGAAA	AtFAD2	655	GACCGTGAAGCGCTCCAGATATATCTCTGTATGCCGATTTCTAGCAGTCTGTTTGGG
CsFAD2-1	118	GCAATCCACCGCAGTGTGTTCAACAGCTCTATCCCTGCTCTTCTCTCTACCTATCACT	CsFAD2-1	718	CTTTACCGTTACCGTCTGCACAAAGGATGGGCTCGATGATCTGCCTCTACGAGTACCA
CsFAD2-2	118	GCAATCCACCGCAGTGTGTTCAACAGCTCTATCCCTGCTCTTCTCTCTACCTATCACT	CsFAD2-2	718	CTTTACCGTTACCGTCTGCACAAAGGATGGGCTCGATGATCTGCCTCTACGAGTACCA
CsFAD2-3.1	121	GCAATCCACCGCAGTGTGTTCAACAGCTCTATCCCTGCTCTTCTCTCTACCTATCACT	CsFAD2-3.1	721	CTTTACCGTTACCGTCTGCACAAAGGATGGGCTCGATGATCTGCCTCTACGAGTACCA
AtFAD2	115	GCAATCCACCGCAGTGTGTTCAACAGCTCTATCCCTGCTCTTCTCTCTACCTATCACT	AtFAD2	715	CTTTACCGTTACCGTCTGCACAAAGGATGGGCTCGATGATCTGCCTCTACGAGTACCA
CsFAD2-1	178	GACATCATTTTGGCTCTCTCTCTACTACGTCGCGACCAATTAATCTCTCTCTCTCT	CsFAD2-1	778	CTTCTGATAGTTAAGCGTCTCTCTCTGATCACTTACTTTCAGCAGCACTCATCTCGG
CsFAD2-2	178	GACATCATTTTGGCTCTCTCTCTACTACGTCGCGACCAATTAATCTCTCTCTCTCT	CsFAD2-2	778	CTTCTGATAGTTAAGCGTCTCTCTCTGATCACTTACTTTCAGCAGCACTCATCTCGG
CsFAD2-3.1	181	GACATCATTTTGGCTCTCTCTCTACTACGTCGCGACCAATTAATCTCTCTCTCTCT	CsFAD2-3.1	781	CTTCTGATAGTTAAGCGTCTCTCTCTGATCACTTACTTTCAGCAGCACTCATCTCGG
AtFAD2	175	GACATCATTTTGGCTCTCTCTCTACTACGTCGCGACCAATTAATCTCTCTCTCTCT	AtFAD2	775	CTTCTGATAGTTAAGCGTCTCTCTCTGATCACTTACTTTCAGCAGCACTCATCTCGG
CsFAD2-1	238	CAGCCTCTCTTCTTCTTGGCTGCGCCCTCTAATGGGCTGTCAAGGCTGTGCTTAACC	CsFAD2-1	838	TTGCTCTACTACGATTCATCCGAGTGGGATGGCTTAGGGAGCTTTGGCTACGCTAGAC
CsFAD2-2	238	CAGCCTCTCTTCTTCTTGGCTGCGCCCTCTAATGGGCTGTCAAGGCTGTGCTTAACC	CsFAD2-2	838	TTGCTCTACTACGATTCATCCGAGTGGGATGGCTTAGGGAGCTTTGGCTACGCTAGAC
CsFAD2-3.1	241	CAGCCTCTCTTCTTCTTGGCTGCGCCCTCTAATGGGCTGTCAAGGCTGTGCTTAACC	CsFAD2-3.1	841	TTGCTCTACTACGATTCATCCGAGTGGGATGGCTTAGGGAGCTTTGGCTACGCTAGAC
AtFAD2	235	CAGCCTCTCTTCTTCTTGGCTGCGCCCTCTAATGGGCTGTCAAGGCTGTGCTTAACC	AtFAD2	835	TTGCTCTACTACGATTCATCCGAGTGGGATGGCTTAGGGAGCTTTGGCTACGCTAGAC
CsFAD2-1	298	GGTGTCTGGGTCATAGCCCAAGATCGGTCACCAAGCATTCAGGACTACCAATGGCTT	CsFAD2-1	898	AGAGACTATGGAATCTTGACAAAGGTGTTCCACACATACCGGACACATGTGGCTCAT
CsFAD2-2	298	GGTGTCTGGGTCATAGCCCAAGATCGGTCACCAAGCATTCAGGACTACCAATGGCTT	CsFAD2-2	898	AGAGACTATGGAATCTTGACAAAGGTGTTCCACACATACCGGACACATGTGGCTCAT
CsFAD2-3.1	301	GGTGTCTGGGTCATAGCCCAAGATCGGTCACCAAGCATTCAGGACTACCAATGGCTT	CsFAD2-3.1	901	AGAGACTATGGAATCTTGACAAAGGTGTTCCACACATACCGGACACATGTGGCTCAT
AtFAD2	295	GGTGTCTGGGTCATAGCCCAAGATCGGTCACCAAGCATTCAGGACTACCAATGGCTT	AtFAD2	895	AGAGACTATGGAATCTTGACAAAGGTGTTCCACACATACCGGACACATGTGGCTCAT
CsFAD2-1	358	GATGACACAGTTGGCTTATCTTCCATTCCTTCTCTGTCCTTACTTCTCTCTGGAAG	CsFAD2-1	958	CATCTGTTTTCGCAATGCCGATTATAATGCGATGGAAGCTACAAAGCGGATAAGCCA
CsFAD2-2	358	GATGACACAGTTGGCTTATCTTCCATTCCTTCTCTGTCCTTACTTCTCTCTGGAAG	CsFAD2-2	958	CATCTGTTTTCGCAATGCCGATTATAATGCGATGGAAGCTACAAAGCGGATAAGCCA
CsFAD2-3.1	361	GATGACACAGTTGGCTTATCTTCCATTCCTTCTCTGTCCTTACTTCTCTCTGGAAG	CsFAD2-3.1	961	CATCTGTTTTCGCAATGCCGATTATAATGCGATGGAAGCTACAAAGCGGATAAGCCA
AtFAD2	355	GATGACACAGTTGGCTTATCTTCCATTCCTTCTCTGTCCTTACTTCTCTCTGGAAG	AtFAD2	955	CATCTGTTTTCGCAATGCCGATTATAATGCGATGGAAGCTACAAAGCGGATAAGCCA
CsFAD2-1	418	TACAGTATCCGCTTACCATTCACCAACAGGATCTCGAAGAGAGATGAAGATTGTTC	CsFAD2-1	1018	ATATCCGCTGACTATTACAGGTTTCGACGGAACACCTGATGATGGGCTATGATAGGAG
CsFAD2-2	418	TACAGTATCCGCTTACCATTCACCAACAGGATCTCGAAGAGAGATGAAGATTGTTC	CsFAD2-2	1018	ATATCCGCTGACTATTACAGGTTTCGACGGAACACCTGATGATGGGCTATGATAGGAG
CsFAD2-3.1	421	TACAGTATCCGCTTACCATTCACCAACAGGATCTCGAAGAGAGATGAAGATTGTTC	CsFAD2-3.1	1021	ATATCCGCTGACTATTACAGGTTTCGACGGAACACCTGATGATGGGCTATGATAGGAG
AtFAD2	415	TACAGTATCCGCTTACCATTCACCAACAGGATCTCGAAGAGAGATGAAGATTGTTC	AtFAD2	1015	ATATCCGCTGACTATTACAGGTTTCGACGGAACACCTGATGATGGGCTATGATAGGAG
CsFAD2-1	478	CCAAAGCAGAAATCTGCTATCAAGTGGTATGGCAATACCTCAACAACTCTCTGGAGCC	CsFAD2-1	1078	GCAAAGGAGTGTATCTATGTAGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAGGTGTGTACTGG
CsFAD2-2	478	CCAAAGCAGAAATCTGCTATCAAGTGGTATGGCAATACCTCAACAACTCTCTGGAGCC	CsFAD2-2	1078	GCAAAGGAGTGTATCTATGTAGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAGGTGTGTACTGG
CsFAD2-3.1	481	CCAAAGCAGAAATCTGCTATCAAGTGGTATGGCAATACCTCAACAACTCTCTGGAGCC	CsFAD2-3.1	1081	GCAAAGGAGTGTATCTATGTAGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAGGTGTGTACTGG
AtFAD2	475	CCAAAGCAGAAATCTGCTATCAAGTGGTATGGCAATACCTCAACAACTCTCTGGAGCC	AtFAD2	1075	GCAAAGGAGTGTATCTATGTAGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAGGTGTGTACTGG
CsFAD2-1	538	ATCATGATGTTAACCGTCCAGTTTGTCTCGGCTGGCCCTTGATCTTGGCTTTAACGTC	CsFAD2-1	1138	TACAAACATAAGTTATGA (93.1%)
CsFAD2-2	538	ATCATGATGTTAACCGTCCAGTTTGTCTCGGCTGGCCCTTGATCTTGGCTTTAACGTC	CsFAD2-2	1138	TACAAACATAAGTTATGA (93.4%)
CsFAD2-3.1	541	ATCATGATGTTAACCGTCCAGTTTGTCTCGGCTGGCCCTTGATCTTGGCTTTAACGTC	CsFAD2-3.1	1141	TACAAACATAAGTTATGA (93.5%)
AtFAD2	535	ATCATGATGTTAACCGTCCAGTTTGTCTCGGCTGGCCCTTGATCTTGGCTTTAACGTC	AtFAD2	1135	TACAAACATAAGTTATGA

(B)

CsFAD2-3.1	1	ATGGGTGACAGTGGAGAAATGCCGTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCCAGAAATCTGAAACC
Csa15g016000.1	1	ATGGGTGACAGTGGAGAAATGCCGTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCCAGAAATCTGAAACC
CsFAD2-3	1	ATGGGTGACAGTGGAGAAATGCCGTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCCAGAAATCTGAAACC
CsFAD2-3.1	601	TGGGCGAGACCATACGAGGTTGCGTTCGCAATTTCTTCCCAACGCTCCCATCTACAA
Csa15g016000.1	601	TGGGCGAGACCATACGAGGTTGCGTTCGCAATTTCTTCCCAACGCTCCCATCTACAA
CsFAD2-3	598	TGGGCGAGACCATACGAGGTTGCGTTCGCAATTTCTTCCCAACGCTCCCATCTACAA
CsFAD2-3.1	841	TTGCTCTACTACGATTCATCCGAGTGGGATGGCTTAGGGAGACTTTGGCTACCGTTGAC
Csa15g016000.1	841	TTGCTCTACTACGATTCATCCGAGTGGGATGGCTTAGGGAGACTTTGGCTACCGTTGAC
CsFAD2-3	838	TTGCTCTACTACGATTCATCCGAGTGGGATGGCTTAGGGAGACTTTGGCTACCGTTGAC

(D)

CsFAD2-3.1	1	MGAGGRMPVSSSSSKKSETDAIKRVPCEKPPFTLGLKKAIPPOCFKRSIPRSFSYLIT
Csa15g016000.1	1	MGAGGRMPVSSSSSKKSETDAIKRVPCEKPPFTLGLKKAIPPOCFKRSIPRSFSYLIT
CsFAD2-3	1	MGAGGRMPVSSSSSKKSETDAIKRVPCEKPPFTLGLKKAIPPOCFKRSIPRSFSYLIT

(C)

CsFAD2-1	1	MGAGGRMPVSSSSSKKSETDAIKRVPCEKPPFTLGLKKAIPPOCFKRSIPRSFSYLIT
CsFAD2-2	1	MGAGGRMPVSSSSSKKSETDAIKRVPCEKPPFTLGLKKAIPPOCFKRSIPRSFSYLIT
CsFAD2-3.1	1	MGAGGRMPVSSSSSKKSETDAIKRVPCEKPPFTLGLKKAIPPOCFKRSIPRSFSYLIT
AtFAD2	1	MGAGGRMPVSSSSSKKSETDAIKRVPCEKPPFTLGLKKAIPPOCFKRSIPRSFSYLIT
CsFAD2-1	60	DIIIVASCFYVATNYFSLLPOPLSYLAWLWYACGCVLTGVWVIAHECGHAFSDYOWL
CsFAD2-2	60	DIIIVASCFYVATNYFSLLPOPLSYLAWLWYACGCVLTGVWVIAHECGHAFSDYOWL
CsFAD2-3.1	61	DIIIVASCFYVATNYFSLLPOPLSYLAWLWYACGCVLTGVWVIAHECGHAFSDYOWL
AtFAD2	59	DIIIVASCFYVATNYFSLLPOPLSYLAWLWYACGCVLTGVWVIAHECGHAFSDYOWL
CsFAD2-1	120	DDTVGLIFHSFLLPYFVSWKYSRRHHHSNTGSLERDEVFPVKQSAIKWYKYLNNPAGR
CsFAD2-2	120	DDTVGLIFHSFLLPYFVSWKYSRRHHHSNTGSLERDEVFPVKQSAIKWYKYLNNPAGR
CsFAD2-3.1	121	DDTVGLIFHSFLLPYFVSWKYSRRHHHSNTGSLERDEVFPVKQSAIKWYKYLNNPAGR
AtFAD2	119	DDTVGLIFHSFLLPYFVSWKYSRRHHHSNTGSLERDEVFPVKQSAIKWYKYLNNPAGR
CsFAD2-1	180	IMMLTVQFVFLGWPLYLAFNVSGRYPDGFACHFFNPAPYNDRELRQIYLSDAGILAVCFG
CsFAD2-2	180	IMMLTVQFVFLGWPLYLAFNVSGRYPDGFACHFFNPAPYNDRELRQIYLSDAGILAVCFG
CsFAD2-3.1	181	IMMLTVQFVFLGWPLYLAFNVSGRYPDGFACHFFNPAPYNDRELRQIYLSDAGILAVCFG
AtFAD2	179	IMMLTVQFVFLGWPLYLAFNVSGRYPDGFACHFFNPAPYNDRELRQIYLSDAGILAVCFG
CsFAD2-1	240	LYRYAAAGQGLASMIICLYGVPLLVNNAFLVLIYTLQHTHPALPHYDSSSEWDRLGALATVD
CsFAD2-2	240	LYRYAAAGQGLASMIICLYGVPLLVNNAFLVLIYTLQHTHPALPHYDSSSEWDRLGALATVD
CsFAD2-3.1	241	LYRYAAAGQGLASMIICLYGVPLLVNNAFLVLIYTLQHTHPALPHYDSSSEWDRLGALATVD
AtFAD2	239	LYRYAAAGQGLASMIICLYGVPLLVNNAFLVLIYTLQHTHPALPHYDSSSEWDRLGALATVD
CsFAD2-1	300	RDYGLLNKVFHNITDTHVAHHLFSTMPHYNAMEATKAIPKILGDYQFDGTPWYVAMYRE
CsFAD2-2	300	RDYGLLNKVFHNITDTHVAHHLFSTMPHYNAMEATKAIPKILGDYQFDGTPWYVAMYRE
CsFAD2-3.1	301	RDYGLLNKVFHNITDTHVAHHLFSTMPHYNAMEATKAIPKILGDYQFDGTPWYVAMYRE
AtFAD2	299	RDYGLLNKVFHNITDTHVAHHLFSTMPHYNAMEATKAIPKILGDYQFDGTPWYVAMYRE
CsFAD2-1	360	AKECIYVEPDREGDKKGVYWNKL (95.8%)
CsFAD2-2	360	AKECIYVEPDREGDKKGVYWNKL (96.3%)
CsFAD2-3.1	361	AKECIYVEPDREGDKKGVYWNKL (95.8%)
AtFAD2	359	AKECIYVEPDREGDKKGVYWNKL

Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *FAD2* genes from *Camelina* and *Arabidopsis*. Non-conserved nucleic acid or amino acid residues are shaded in black and conservatively substituted residues are shaded in gray. (A) Nucleotide sequences between *FAD2* genes from *Camelina* and *Arabidopsis*. Numbers (%) mean identity of nucleotide sequences of *CsFAD2*s compared to *AtFAD2*. (B) Nucleotide sequences among *CsFAD2-3.1* gene from this study, *CsFAD2-3* gene from Kang et al (2011) and *Csa15g016000.1* from *Camelina* genome database. (C) Amino acid sequences of *FAD2*s between *Camelina* and *Arabidopsis*. Three conserved histidine boxes of *CsFAD2*s and *AtFAD2* are shown in boxes. ER-retrieval motif (YNNKL) is presented by a broken line. The underlines indicate prediction of transmembrane helices (TM) which were analyzed by the TMHMM Server v. 2.0 program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Numbers (%) mean identity of deduced amino acid sequences of *CsFAD2*s compared to *AtFAD2*. (D) Amino acid sequences among *CsFAD2-3.1* gene from this study, *CsFAD2-3* gene from Kang et al (2011) and *Csa15g016000.1* from *Camelina* genome database

것이 확인되었고, *CsFAD2-3.1*, *CsFAD2-3* 그리고 *Csa15g016000.1*의 다른 위치에서 보이는 염기서열 변화는 아미노산의 변화를 유도하지 않았다(Fig. 1D). 또한 FAD2 효소의 활성을 결정짓는 촉매 부위로 알려져 있는 3개의 histidine box가 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2*와 *CsFAD2-3.1*에 ‘HECGH’, ‘HRRHH’ 그리고 ‘HVAHH’로 각각 존재하며(Shanklin and Carhoon 1998; Shanklin et al. 1994), 6개의 transmembrane domain (TM1~TM6)과 C-말단에 소포체-retrieval motif인 ‘YNNKL’

서열이 모든 카멜리나 FAD2에 존재함이 확인되었다(Fig. 1C).

다양한 식물체와 카멜리나 FAD2들의 계통도 분석

카멜리나 FAD2 유전자들의 염기서열로부터 연역된 아미노산 서열을 바탕으로 NCBI 데이터베이스 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 여러 식물들의 FAD2들과의 근연

Fig. 2 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequences of FAD2 genes from plants. Phylogenetic analysis was generated using MEGA5.05 by the neighbor-joining method. Bootstrap value percentages of 1,000 replicates are shown at the branching points. Three FAD2 genes from Camelina (cv. CAME) are shown in grey box. The GenBank accession numbers for the listing FAD2 are: AtFAD2, AtFAD3, AtFAD6, AtFAD7 and AtFAD8 from *Arabidopsis thaliana*, AAA32782, NP180559, NP194824, NP187727 and NP196177; AhFAD2-1A from *Arachis hypogaea*, AAB84262; BnFAD2-1, BnFAD2-2 and BnFAD2-4 from *Brassica napus*, AAS92240, AAF78778 and AAT02411; BrFAD2-1 from *Brassica rapa*, AEA76336; CsFAD2-3 from *Camelina sativa* cv. Suneson, ADU18249; ChFAD2-C1, ChFAD2-C2 and ChFAD2-C3 from *Crambe hispanica*, AGS12442, AGS12443 and AGS12444; CaFAD2-2 and CaFAD2-3 from *Crepis alpina*, ABC00770 and ABC00771; CtFAD2-1 from *Carthamus tinctorius*, AGC65498; GmFAD2-1A and GmFAD2-1B from *Glycine max*, NP001238342 and XP006605885; JcFAD2-1 and JcFAD2-2 from *Jatropha curcas*, AEW43690 and AEW43691; OsFAD2 from *Oryza sativa*, ACN87220; PfFAD2 from *Physaria fendleri*, SiFAD2 from *Sesamum indicum*, AAX11454.1; AGT36609; VfFAD2 from *Vernicia fordii*, AAN87573; VIFAD2-1 and VIFAD2-2 from *Vitis labrusca*, AEI60128 and AEI60129; XsFAD2 from *Xanthoceras sorbifolia*, AGO32050; ZmFAD2 from *Zea mays*, NP001149122 and ABV44669

관계를 확인하기 위하여 계통도 분석을 수행하였다. 먼저 3개의 카멜리나 FAD2는 애기장대 FAD3, FAD6, FAD7 그리고 FAD8들 대비 다양한 식물의 FAD2와 매우 근접하게 위치하였다. 그리고 진화적으로 FAD2는 단자엽 식물군과 쌍자엽 식물군의 clade에 따라 나뉘어지는 것으로 보아 FAD2의 다양성은 단자엽 식물군과 쌍자엽 식물군의 분화 이후 일어났을 것으로 여겨진다. 더불어, 3개의 카멜리나 FAD2는 같은 십자화과에 속하는 애기장대, 배추, 유채, 크램비 그리고 *P. fendleri* 식물과 근연관계가 높았으며, 특히 십자화과 식물들의 FAD2중에서 카멜리나 FAD2는 가장 최근에 분리되었음을 확인하였다(Fig. 2).

카멜리나 식물체에서 *CsFAD2* 유전자들의 발현 분석

카멜리나의 성장과 발달 동안 *CsFAD2* 유전자들의 발현을 분석하고자 3주 동안 배양한 뿌리를 제외한 지상부 조직, 5주 동안 생육한 카멜리나의 잎, 줄기, 개화하지 않은 꽃 그리고 카멜리나의 개화한 꽃, 개화 후 10일에서 20일된 발달하는 종자로부터 RNA를 추출한 다음 이를

Fig. 3 RT-PCR analysis of three *CsFAD2* genes in various camelina organs. 3WP, 3-week-old whole plants without roots. Le, St and Bu, leaves, stems and buds from 5-week-old plants, respectively. OF, open flowers from 6-week-old plants. DS, developing seeds at 10 to 20 days after flowering. The quantity and quality of cDNAs were determined by using Camelina Actin gene, *CsACTIN11* (Hutcheon et al., 2010)

주형으로 3개의 카멜리나 *CsFAD2* 유전자 특이적 프라이머(Kang et al. 2011)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. *CsFAD2-1* 유전자의 경우 3주 동안 생육한 카멜리나 지상부, 잎, 줄기, 꽃봉오리에서 발현을 보였고, 그리고 개화한 꽃과 발달하는 종자에서 강한 발현을 보였다. 반면에, *CsFAD2-2*의 경우는 발달하는 종자에서만 특이적으로 발현이 되는 것이 확인되었고, *CsFAD2-3.1*은 개화하기 전 꽃, 개화한 꽃 그리고 발달하는 종자에서 발현이 강하게 관찰되었고, 잎과 줄기에서 매우 약하게 발현되었다(Fig. 3).

애기장대 *fad2-2* 돌연변이체에 *CsFAD2* 유전자들의 형질전환

카멜리나 품종 CAME으로부터 분리한 3개 *FAD2* 유전자들의 기능을 식물에서 확인하기 위하여, 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체에 *CsFAD2* 유전자들을 각각 도입하였다. 먼저 제초제 저항성능을 부여하는 *PAT* 유전자를 포함하는 pCambia3300 vector를 선택하였고, 발달하는 애기장대 전 조직에서 발현을 유도하기 위하여 CaMV35S 프로모터 하에서 도입된 유전자가 발현되도록 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1* 유전자를 각각 삽입하여 binary vector를 제작하였다(Fig. 4A). 제작된 binary vector가 형질전환된 *fad2-2* 돌연변이체의 종자를 확보하여 PPT 항생제를 이용하여 1차 선별 후, 선별된 형질전환 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 각 형질전환 식물체 DNA를 주형으로 CaMV35S 프로모터에 위치하는 프라이머와 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1* 유전자들의 염기서열에 위치하는 특이적 프라이머를(Table 1) 사용하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. 그 결과, 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체에 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1* 유전자들이 도입된 형질전환 식물체를 각각 7개체씩 확보하였다(Fig. 4B).

Fig. 4 Generation of transgenic Arabidopsis *fad2-2* mutants expressing three *CsFAD2* genes under the control of CaMV 35S promoter. (A) Schematic diagram of binary vector of three *CsFAD2* isoforms. CaMV35SP, the promoter of cauliflower mosaic virus 35S RNA; NosT, nopaline synthase terminator; PAT, *phosphinothricin acetyltransferase* gene. (B) Genomic DNA PCR analysis for three *CsFAD2* isoforms in transgenic Arabidopsis. N, Arabidopsis *fad2-2* mutant. Numbers indicate individual transgenic Arabidopsis

애기장대 야생형, *fad2-2* 돌연변이체 그리고 *fad2-2* 형질전환 식물체의 종자 지방산 함량 및 성분 분석

형질전환된 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체 종자에서 3개 *CsFAD2* 유전자들의 기능을 확인하기 위하여 애기장대 야생형, *fad2-2* 돌연변이체 그리고 *fad2-2* 돌연변이체에 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1* 유전자들이 형질전환된 식물체 종자에서 지방산 성분 분석을 수행하였다. Figure 5A에서는 애기장대 종자에서 다가불포화 지방산이 생성되는 기작에서 FAD2 효소의 기질과 반응 산물을 나타내고 있다. Table 2와 Figure 5B를 살펴보면, 애기장대 야생형 종자에는 oleic acid, linoleic acid 그리고 linolenic acid의 함량이 각각 약 13%, 32% 그리고 17%의 비율로 존재하였다. 그리고 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체 종자에는 FAD2 효소 기능의 상실로 인하여 linoleic acid와 linolenic acid의 함량이 전체 지방산 중 1%와 2%로 존재하였으며, oleic acid는 반응기질로 사용되지 못하여 전체 지방산 중

66%로 존재하는 것을 확인하였다. *fad2-2* 돌연변이체 종자와 카멜리나 *FAD2* 유전자가 형질전환된 *fad2-2* 형질전환 식물체 종자에서 전체 지방산 성분과 비교하였을 때, 먼저 *CsFAD2-1* 유전자가 도입된 경우 전체 지방산 중 linoleic acid 과 linolenic acid의 함량은 각각 21%와 12%로 증가된 반면, oleic acid 함량은 약 32%로 감소되었다. 이러한 결과와 유사하게 *CsFAD2-2* 유전자가 도입된 경우 linoleic acid 그리고 linolenic acid의 함량이 20%와 12%로 증가된 반면에 oleic acid 함량은 33%로 감소하였고, *CsFAD2-3.1* 유전자가 도입된 경우에도 linoleic acid 과 linolenic acid의 함량이 19%와 15%로 증가하였으며, oleic acid 함량이 약 31%로 감소됨을 확인하였다(Fig. 5B). 더불어 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체 종자에서 palmitic acid (16:0)의 함량 감소와 eicosenoic acid (20:1)의 함량 증가와 같은 돌연변이체 표현형은 카멜리나 *FAD2* 유전자들이 도입된 형질전환 식물체 종자에서 애기장대 야생형 종자에 존재하는 지방산 조성으로 회복됨을 확인하였다(Table

Table 2 Fatty acid analysis of seeds of Arabidopsis wild-type, *fad2-2* and transgenic Arabidopsis *fad2-2* mutants expressing three *CsFAD2* genes. Results are expressed as mole% of fatty acids. Each value from wild-type and *fad2-2* represents the mean $\pm$ SE of triplicate measurements

	Palmitic (16:0)	Stearic (18:0)	Oleic (18:1)	Linoleic (18:2)	Linolenic (18:3)	Arachidic (20:0)	Eicosenoic (20:1)	Eicosadienoic (20:2)	Erucic (22:1)
Wild-type	12.5 $\pm$ 0.0	3.9 $\pm$ 0.0	13.2 $\pm$ 0.0	31.7 $\pm$ 0.0	16.5 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.0	16.7 $\pm$ 0.0	1.9 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.0
<i>fad2-2</i>	5.7 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.1	65.6 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	21.8 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
CsFAD2-1 #1	11.0	3.2	31.7	21.1	10.4	1.6	18.0	1.8	1.2
CsFAD2-1 #2	7.3	3.0	40.7	12.8	12.1	1.4	20.2	1.3	1.2
CsFAD2-1 #3	7.4	2.8	32.2	23.0	12.2	1.6	17.5	1.9	1.4
CsFAD2-1 #4	8.5	3.4	25.9	26.1	13.4	2.0	16.8	2.4	1.5
CsFAD2-1 #5	8.5	3.1	34.6	19.8	11.1	1.7	18.3	1.6	1.3
CsFAD2-1 #6	9.4	3.4	28.1	21.8	12.2	1.8	20.2	1.7	1.4
CsFAD2-1 #7	8.9	3.1	34.2	20.0	11.0	1.6	18.3	1.6	1.3
CsFAD2-2 #1	9.9	3.4	33.0	21.2	10.9	1.8	16.8	1.8	1.2
CsFAD2-2 #2	10.1	3.3	30.4	19.8	12.9	1.6	19.5	1.2	1.2
CsFAD2-2 #3	10.0	3.4	31.7	20.5	11.9	1.7	18.1	1.5	1.2
CsFAD2-2 #4	9.8	3.3	33.5	20.2	11.5	1.8	17.4	1.4	1.1
CsFAD2-2 #5	10.9	3.7	31.6	20.4	12.0	1.9	16.5	2.0	1.0
CsFAD2-2 #6	9.1	3.0	35.9	17.8	11.6	1.9	18.5	1.1	1.1
CsFAD2-2 #7	9.0	3.0	35.9	20.6	10.9	1.9	16.3	1.3	1.1
CsFAD2-3.1 #1	9.3	3.4	18.2	23.5	21.5	2.3	18.5	1.8	1.5
CsFAD2-3.1 #2	9.9	3.5	20.6	20.7	21.7	2.3	17.9	1.9	1.5
CsFAD2-3.1 #3	5.7	2.7	28.9	23.0	15.0	1.3	22.1	0.2	1.1
CsFAD2-3.1 #4	6.8	3.0	40.5	12.7	12.4	1.7	20.6	0.9	1.4
CsFAD2-3.1 #5	5.9	2.8	38.5	18.5	10.0	1.4	21.3	0.4	1.2
CsFAD2-3.1 #6	6.3	2.9	34.1	18.4	12.6	1.4	22.9	0.2	1.2
CsFAD2-3.1 #7	6.3	3.0	34.6	18.0	12.7	1.5	22.2	0.4	1.3

Fig. 5 Schematic diagram illustrating unsaturated fatty acid synthesis in Arabidopsis seeds (A) and fatty acid analysis of seeds of transgenic Arabidopsis *fad2-2* mutants expressing three *CsFAD2* genes (B). The portion of bar graph represented the relative contribution of stearic acids, oleic acids and linoleic acids of transgenic plants seeds. WT, Arabidopsis wild-type seeds. CsFAD2-1, CsFAD2-2 and CsFAD2-3.1, seeds of transgenic Arabidopsis *fad2-2* mutants expressing *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* or *CsFAD2-3.1*

2). 따라서, 이러한 결과들은 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1* 유전자들이 모두 FAD2 효소로서 식물에서 활성을 가지고 있다는 것을 시사한다.

고 찰

FAD2 효소는 oleic acid를 이용한 다가불포화 지방산의 합성에 중추적인 역할을 한다고 알려져 있다(Lemieux et al. 1990). 이에 다양한 식물에서 FAD2 유전자들이 클로닝되었고(Cheng et al. 2013; Chi et al. 2011; Dyer et al. 2002; Guo et al. 2013; Jung et al. 2011; Kang et al. 2011; Kim et al. 2006; Lee et al. 2012; 2013; Liu et al. 2013; Lozinsky et al. 2014; Nam and Kappock 2007; Pham et al. 2010; Qu et al. 2012), 최근 염기서열 분석 기술의 발달로 같은 종의 다양한 품종간 FAD2 대립유전자의 loci에 존재하는 염기서열의 차이가 품종간 종자 내 oleic acid 함량의 차이를 결정짓는 즉 SNP에 의한 polymorphism이 보고되었다(Beló et al. 2008; Pham et al. 2010). 중요한 유지작물 중의 하나인 카멜리나는 품종 Sunesone에서 3개의 FAD2 유전자의 염기서열이 보고되었고(Kang et al. 2011), 최근 품종 SRS933을 이용하여 이루어진 계통 염기서열 분석 결과를 바탕으로 3개의 FAD2 유전자의 염기서열이

확인되었다(Camelina sativa Genome Project; <http://www.camelinadb.ca/>). 본 연구에서는 카멜리나 품종 CAME로부터 3개 FAD2 유전자들을 분리하여, 총 9개의 카멜리나 FAD2 유전자들 및 다양한 식물체의 FAD2 유전자들과 염기서열 및 아미노산 서열을 비교 분석하였다. 더불어 *CsFAD2-1*과 *CsFAD2-3.1*은 전 조직에서 발현되나, *CsFAD2-2*는 종자 특이적 발현을 나타내는 것을 확인하였으며, 3개의 FAD2 유전자들을 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체에 발현시켜, 모두 oleic acid를 이용하여 다가불포화 지방산인 linoleic acid의 합성에 관여하는 효소로서 역할을 한다는 것을 확인하였다.

육배체(hexaploid)로 알려져 있는 카멜리나의 계통은 최근 염기서열 분석을 통해 Cs-G1, Cs-G2 그리고 Cs-G3의 sub-genome으로 구분하였고, 각 sub-genome들의 염기서열과 염색체 지도의 비교분석을 통해 Cs-G1과 Cs-G2 sub-genome은 서로 계통학적 근연관계가 매우 가까운 반면, Cs-G3 sub-genome은 Cs-G1 혹은 Cs-G2 sub-genome과는 상대적으로 근연관계가 멀다는 것을 확인하였다. 그리고 Cs-G3 sub-genome에 존재하는 유전자들은 Cs-G1과 Cs-G2 sub-genome에 속한 유전자들 대비 우성 발현 특성(expression dominance)을 보였다. 따라서 Cs-G1과 Cs-G2 sub-genome은 매우 근접한 종간의 tetraploidization event로 인해 형성되었고, 추가적인 hybridization event에 의해 Cs-G3 sub-genome이 합류되어 형성된 것이라는 가설을 제시하였다(Kagale et al. 2014). 최근 공개된 카멜리나 품종 SRS933 계통 데이터베이스를 활용하여 본 연구에서 클로닝된 *CsFAD2-1*, *CsFAD2-2* 그리고 *CsFAD2-3.1* 염기서열과 비교 분석한 결과, 이들은 각각 *Csa19g016350.1* (Cs-G2 sub-genome), *Csa1g013220.1* (Cs-G3 sub-genome) 그리고 *Csa15g016000.1* (Cs-G1 sub-genome) 유전자와 일치되거나 유사함을 확인하였다(Camelina sativa Genome Project; <http://www.camelinadb.ca/>). 특히, Cs-G3 sub-genome에 속한 *CsFAD2-2*가 전 조직에서 발현되는 다른 2개의 유전자들과 달리 종자 특이적 발현을 보였다. 그러므로 본 연구 결과는 *CsFAD2-2*가 속한 Cs-G3 sub-genome이 아마도 allopolyploid가 형성되는 마지막 단계에 도입되었을 것이라는 가설을 지지한다.

여러 보고를 통해 동일한 종에서 다양한 품종들의 계통에 존재하는 대립유전자의 염기서열 변화에 따라 표현형이 달라지는 polymorphism이 밝혀졌다(Rounsley and Last 2010; Vander Zwan et al. 2000). 옥수수 inbred line (PH09B와 ASKC28IB1)에서는 DGAT1 아미노산 서열의 496번째에 phenylalanine의 삽입으로 인해 종자 내 고오일의 표현형이 관찰되었다(Zheng et al. 2008). 더불어, 또 다른 옥수수의 두 inbred line (PH1B5와 PH09B)에서 옥수수 FAD2대립유전자는 SNP가 존재하는데, N-terminus에 위치하는 transmembrane domain에 아미노산 잔기 중 71번째 non-polar 아미노산인 leucine (PH1B5)과 polar 아미노산인

threonine (PH09B)의 차이를 나타냈고, 이 차이로 인해 PH1B5의 종자에서 high oleic acid의 표현형이 결정되었다고 제시하였다(Beló et al. 2008). 본 연구에서도 카멜리나 품종 CAME의 *CsFAD2-3.1* 염기서열은 카멜리나 품종 Sunesone의 *CsFAD2-3* 염기서열과 비교하였을 때 3 bp의 삽입, 그리고 카멜리나 품종 SRS933의 *Csa15g016000.1*와 비교하였을 때 3개의 SNP를 가지고 있었다. 독특하게도, 카멜리나 품종 중 CAME과 SRS933에 존재하는 *CsFAD2-3.1/Csa15g016000.1*은 염기서열 3 bp의 삽입으로 인해 아미노산 서열 15번째에 아미노산 잔기 serine이 삽입되는 차이를 보였다. 이러한 *CsFAD2-3.1/Csa15g016000.1* 아미노산 서열의 N-terminus에서 관찰되는 serine 삽입에 의한 차이가 카멜리나 품종들간의 polymorphism과 연계되어 있는지는 앞으로 더 밝혀져야 할 것이다.

FAD2 효소는 종자 오일뿐 아니라 세포막에 존재하는 지질의 지방산 성분들의 불포화정도를 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다(Miquel et al. 1993). 여러 식물들에서 발표된 *FAD2* 유전자들의 발현 양상을 살펴보면 발달하는 종자뿐 아니라 그 외 식물의 모든 조직에서도 발현되는 것을 볼 수 있고, 따라서 이러한 발현 양상의 분석을 통해 각 효소들의 기능을 유추해 볼 수 있다. 애기장대와 배추의 *FAD2*는 현재까지 활성을 보유한 *FAD2*를 암호화하는 유전자가 각각 하나씩 보고되었는데, 그 발현은 발달하는 종자를 포함한 전 조직에서 발현되고 있음이 확인되었다. 따라서 이 *FAD2* 효소는 전 조직에서의 다가불포화 지방산의 합성에 관여할 것으로 생각된다(Jung et al. 2011; Miquel et al. 1993). 반면, 카멜리나는 *FAD2*를 암호화하고 있는 3개 유전자들의 발현 양상이 종자 특이적으로 발현되거나 전 조직에서 발현되는 양상으로 나뉜다. 따라서 종자에서 특이적 발현을 보이는 *CsFAD2-2*는 저장 오일에 존재하는 다가불포화 지방산의 합성에 크게 기여할 것이고, 전 조직에서 발현을 보이는 *CsFAD2-1*과 *CsFAD2-3.1*은 아마도 종자의 저장 오일뿐 아니라 세포막 지질에 존재하는 다가불포화 지방산의 합성에 관여할 것이다.

종자 오일의 생합성에서 다가불포화 지방산의 생합성이 소포체에서 일어나는 것과 일치하게 *FAD2* 효소도 소포체에 존재한다고 알려져 있고, 특징적으로 C-말단에 방향족 아미노산으로 구성된 -ΦXXKΦ- (Φ, 소수성 아미노산)서열로 이루어진 소포체(ER)-retrieval motif를 가지고 있다(McCartney et al. 2004). 또한, *FAD2*는 소포체의 막에 존재하기 위한 5~6개의 transmembrane domain과 *FAD2* 효소의 활성화에 중요한 3개의 histidine motifs (HXXXH, HXXHH와 QXXHH)가 존재한다고 알려져 있다(Shanklin et al. 1994). 더불어 최근에는 옥수수 *FAD2*의 N-terminal region에 존재하는 transmembrane domain에 nonpolar R group을 갖는 아미노산 잔기인 71번째 leucine이 효소의 활성화에

영향을 줄 수 있다고 제시하였다(Beló et al. 2008). 본 연구에서 분리한 3개의 카멜리나 *FAD2*에도 특징적인 소포체-retrieval motif, histidine motifs와 transmembrane domains이 확인되었고, *CsFAD2-1*과 *CsFAD2-2*에는 63번째 아미노산에 nonpolar R group을 갖는 valine과 isoleucine이 각각 존재하였으며, *CsFAD2-3.1*에는 64번째 아미노산에 valine이 확인되었다.

최근 카멜리나 *FAD2*유전자들의 염기서열 유사성에 근거하여 종자특이적 프로모터 하에서 antisense 방향의 *CsFAD2-1* 유전자를 발현시켜 3개의 *FAD2* 유전자들의 발현이 모두 억제된 카멜리나 형질전환 식물체를 제작하였고, 비형질전환체와 비교하였을 경우 형질전환된 카멜리나의 종자 지방산 중 linoleic acid와 linolenic acid의 함량이 약 10%와 18% 비율로 각각 감소한 반면 oleic acid의 함량이 약 25~33% 비율로 증가되었다(Kang et al. 2011). 이 연구에서는 비록 카멜리나에 존재하는 *FAD2* 효소가 종자 내 다가불포화 지방산의 합성에 크게 기여할 수 있다는 것을 보여주었지만, 3개의 *CsFAD2* 유전자들 각각의 식물체에서 효소 활성은 확인하지 못하였다. 그러나 본 연구에서는 3개의 카멜리나 *FAD2* 유전자들(*CsFAD2-1*, *CsFAD2-2*, *CsFAD2-3.1*)을 애기장대 *fad2-2* 돌연변이 식물체로의 각각 발현시켜 비형질전환체와 비교하였을 때, 애기장대 *fad2-2* 형질전환 식물체의 종자 지방산 중 oleic acid의 함량이 평균 33%로 감소하였고, linoleic acid와 linolenic acid 함량의 합이 평균 30%이상 증가됨을 각각 확인함으로써 3개의 카멜리나 *FAD2* 효소들이 모두 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

또한, 흥미롭게도 CaMV35S 프로모터 하에 카멜리나 *FAD2* 유전자들을 발현시킨 *fad2-2* 형질전환 식물체 종자에는 애기장대 야생형과 비교하여 oleic acid의 함량이 여전히 높은 비중을 차지하고 있었다. 본 결과와 유사하게 CaMV35S 프로모터 하에 배추 혹은 벼 *FAD2* 유전자를 애기장대 *fad2-2* 돌연변이 식물체에 발현시킨 경우, 종자 및 잎에서 oleic acid의 함량이 애기장대 야생형보다 약 40% 높은 비중을 차지하고 있었다(Jung et al. 2011; Shi et al. 2012). 이러한 결과는 종자 성숙 시기 보다 특이적으로 배 발달 시기에 가장 강하게 발현되는 것으로 알려진 애기장대 *FAD2* 유전자와는 달리, CaMV35S 프로모터는 식물 전 조직에서 발현되므로, 아마도 형질전환 식물체에서 *FAD2* 유전자들의 발현 양상의 차이에 의해 표현형이 부분적으로 회복되었을 것이다(Odell et al. 1985; Arabidopsis eFP Browser; http://bar.utoronto.ca/efp_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi). 또한, *FAD2* 효소는 *FAD3*와 heterodimer를 형성함으로써 oleic acid를 전구체로 사용하여 linolenic acid를 합성하는 과정에서 metabolic channeling이 일어난다고 보고되었다(Lou et al. 2014). 따라서 카멜리나 *FAD2*와 애기장대 *FAD3*간의 상호작용에 필요한 구조적인 차

이에 의해 야기된 metabolic flux의 변화가 형질전환 식물체 표현형의 부분 회복에 대한 또 다른 설명일 수 있다.

본 연구에서는 카멜리나에 존재하는 3개의 *CsFAD2* 유전자들이 oleic acid를 기질로 linoleic acid를 합성할 수 있는 활성을 가진 효소임을 확인하였다. 또한, 육배체인 카멜리나의 경우 Cs-G3 sub-genome에 존재하는 유전자 *CsFAD2-2*가 Cs-G1과 Cs-G2 sub-genome에 존재하는 *CsFAD2-1*과 *CsFAD2-3.1* 유전자들과 비교하여 계통도 분석과 발현 분석을 통해 카멜리나의 계통 형성이 아마도 allopolyploid에 의한 것이라는 가설을 지지할 수 있는 증거를 마련하였다. 더불어 oleic acid가 많은 작물들은 인간들의 식량자원 및 산업자원으로 널리 대중화되고 있기 때문에(ISAAA; International service for the acquisition of agri-biotech applications) 카멜리나로부터 분리한 *FAD2* 유전자들을 이용한 유전자 재조합 기술은 종자 오일 내 지방산 조성이 변화된 유지작물을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

적 요

카멜리나(*Camelina sativa*)는 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 유지작물이다. 카멜리나 종자에는 건물 중의 약 40%에 해당하는 저장 오일을 가지고 있고, 이러한 저장 오일은 식품뿐만 아니라 산업재료로 이용이 가능하다. Microsomal delta-12 fatty acid desaturase2 (*FAD2*) 효소는 oleic acid를 linoleic acid로 전환시키는데, 종자 내 oleic acid의 함량 차이를 보이는 품종들에서 *FAD2* 유전자의 polymorphism이 보고되었다. 본 연구에서는 카멜리나(*Camelina sativa* L. 품종 CAME)에 존재하는 3개의 *FAD2* 유전자를 발달하는 종자로부터 분리하였다. 3개의 카멜리나 *FAD2* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열은 카멜리나 품종 Sunesone과 SRS933으로부터 확인된 *FAD2* 유전자들과 여러 단자엽 및 쌍자엽 식물의 *FAD2* 유전자들의 염기서열 및 아미노산 서열과 상동성을 비교하였다. *FAD2* 효소의 활성을 결정짓는다고 알려진 histidine motif (HECGHH, HRRHH 그리고 HVAHH)와 효소 활성에 영향을 주는 SNP (single nucleotide polymorphism) 마커라고 알려진 소수성 아미노산 계열인 valine 혹은 isoleucine이 3 개의 카멜리나 *FAD2*에서도 잘 보존되어 있음을 확인하였다. 세 개의 카멜리나 *FAD2* 유전자들 중 *CsFAD2-1*의 경우 카멜리나의 발달하는 조직에서 전반적으로 높은 발현 양상을 보이는 반면 *CsFAD2-2*와 *CsFAD2-3.1*은 꽃과 발달하는 종자에서 특이적인 발현을 보였다. 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체에 3개의 카멜리나 *FAD2*를 각각 도입한 형질전환 식물체의 종자에는 애기장대 *fad2-2* 돌연변이체 종자대비 oleic acid의 함량이 감소하고, linoleic acid 함량은 증가하는 표현형이 관찰되었다. 이러한 결과는 카멜리나로부

터 분리된 3개의 *FAD2*가 효소로서 활성을 가지고 있다는 것을 의미한다. 더불어 분리된 카멜리나의 *FAD2* 유전자는 종자 오일 성분이 변화된 유지작물을 개발하는데 응용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업 IPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology; No. 312033-5) 그리고 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21 프로그램(Next-Generation of BioGreen 21 Program; No. PJ008203)의 지원으로 수행된 연구결과입니다.

References

- Bechtold N, Pelletier G (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* 82:259-266
- Beló A, Zheng P, Luck S, Shen B, Meyer DJ, Li B, Tingey S, Rafalski A (2008) Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize. *Mol Genet Genomics* 279:1-10
- Budin J, Breene W, Putnam D (1995) Some compositional properties of camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) seeds and oils. *J Am Oil Chem Soc* 72:309-315
- Cheng J, Zhu L-H, Salentijn EMJ, Huang B, Gruber J, Dechesne AC, Krens FA, Qi W, Visser RG, and van Loo EN (2013) Functional analysis of the omega-6 fatty acid desaturase (*CaFAD2*) gene family of the oil seed crop *Crambe abyssinica*. *BMC Plant Biol* 13:146
- Chi X, Yang Q, Pan L, Chen M, He Y, Yang Z, Yu S (2011) Isolation and characterization of fatty acid desaturase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep* 30: 1393-1404
- Dyer JM, Chapital DC, Kuan JC, Mullen RT, Turner C, McKeon TA, Pepperman AB (2002) Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity. *Plant Physiol* 130:2027-2038
- Gimeno RE, Cao J (2008) Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *J Lipid Res* 49:2079-2088
- Guo HH, Li QQ, Wang TT, Hu Q, Deng WH, Xia XL, Gao HB (2013) *XsFAD2* gene encodes the enzyme responsible for the high linoleic acid content in oil accumulated in *Xanthoceras sorbifolia* seeds. *J Sci Food Agric* 94:482-488
- Hutcheon C, Ditt RF, Beilstein M, Comai L, Schroeder J, Goldstein E, Shewmaker CK, Nguyen T, De Rocher J, Kiser J (2010) Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes. *BMC Plant Biol* 10:233

- Jung JH, Kim H, Go YS, Lee SB, Hur CG, Kim HU, Suh MC (2011) Identification of functional *BrFAD2-1* gene encoding microsomal delta-12 fatty acid desaturase from *Brassica rapa* and development of *Brassica napus* containing high oleic acid contents. *Plant Cell Rep* 30:1881–1892
- Kagale S, Koh C, Nixon J, Bollina V, Clarke WE, Tuteja R, Spillane C, Robinson SJ, Links MG, Clarke C, Higgins EE, Huebert T, Sharpe AG, Parkin IA (2014) The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. *Nat Commun* 5:3706
- Kang J, Snapp AR, Lu C (2011) Identification of three genes encoding microsomal oleate desaturases (FAD2) from the oilseed crop *Camelina sativa*. *Plant Physiol Biochem* 49:223–229
- Kennedy EP (1961) Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol* 20:934–940
- Kim MJ, Kim H, Shin JS, Chung CH, Ohlrogge JB, Suh MC (2006) Seed-specific expression of sesame microsomal oleic acid desaturase is controlled by combinatorial properties between negative cis-regulatory elements in the SeFAD2 promoter and enhancers in the 5'-UTR intron. *Mol Genet Genomics* 276:351–368
- 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
- Le Corre V, Roux F, Reboud X (2002) DNA polymorphism at *FRIGIDA* gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive nonsynonymous variation is consistent with local selection for flowering time. *Mol Biol Evol* 19(8):1261–1271
- Lee KR, Kim SH, Go YS, Jung SM, Roh KH, Kim JB, Suh MC, Lee S, Kim HU (2012) Molecular cloning and functional analysis of two *FAD2* genes from American grape (*Vitis labrusca* L.). *Gene* 509:189–194
- Lee KR, Sohn IS, Jung JH, Kim SH, Roh KH, Kim JB, Suh MC, Kim HU (2013) Functional analysis and tissue-differential expression of four *FAD2* genes in amphidiploid *Brassica napus* derived from *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Gene* 531:253–262
- Lemieux B, Miquel M, Somerville C, Browse J. 1990. Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor Appl Genet* 80:234–240
- Liu Q, Cao S, Zhou XR, Wood C, Green A, Singh S (2013) Nonsense-mediated mRNA degradation of *CtFAD2-1* and development of a perfect molecular marker for *olol* mutation in high oleic safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Theor Appl Genet* 126:2219–2231
- Lou Y, Schwender J, Shanklin J (2014) FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling in vivo. *J Biol Chem* 289(26):17996–8007
- Lozinsky S, Yang H, Forseille L, Cook GR, Ramirez-Erosa I, Smith MA (2014) Characterization of an oleate 12-desaturase from *Physaria fendleri* and identification of 5'UTR introns in divergent *FAD2* family genes. *Plant Physiol Biochem* 75:114–122
- McCartney AW, Dyer JM, Dhanoa PK, Kim PK, Andrews DW, McNew JA, Mullen RT (2004) Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *Plant J* 37:156–173
- Miquel M, James Jr D, Dooner H, Browse J (1993) *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6208–6212
- Moser BR (2010) *Camelina* (*Camelina sativa* L.) oil as a biofuels feedstock: Golden opportunity or false hope? *Lipid Technol* 22:270–273
- Moser BR (2012) Biodiesel from alternative oilseed feedstocks: camelina and field pennycress. *Biofuels* 3:193–209
- Nam JW, Kappock TJ (2007) Cloning and transcriptional analysis of *Crepis alpina* fatty acid desaturases affecting the biosynthesis of crepenynic acid. *J Exp Bot* 58:1421–1432
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810–812
- 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
- Oñate-Sánchez L, Vicente-Carbajosa J (2008) DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Res Notes* 1:93
- Pham AT, Lee JD, Shannon JG, Bilyeu KD (2010) Mutant alleles of FAD2-1A and FAD2-1B combine to produce soybeans with the high oleic acid seed oil trait. *BMC Plant Biol* 10:195
- Putnam DH, Budin JT, Field LA, Breene WM (1993) *Camelina*: A promising low-input oilseed. In: Janick J, Simon JE, (eds.), *New crops*, Wiley, New York, pp 314–322
- Qu J, Mao HZ, Chen W, Gao SQ, Bai YN, Sun YW, Geng YF, Ye J (2012) Development of marker-free transgenic *Jatropha* plants with increased levels of seed oleic acid. *Biotechnol Biofuels* 5:10
- Rodríguez-Rodríguez MF, Sánchez-García A, Salas JJ, Garcés R, Martínez-Force E (2013) Characterization of the morphological changes and fatty acid profile of developing *Camelina sativa* seeds. *Ind Crops Prod* 50:673–679
- Rounsley SD, Last RL (2010) Shotguns and SNPs: how fast and cheap sequencing is revolutionizing plant biology. *The Plant J* 61:922–927
- Shanklin J, Cahoon EB (1998) Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:611–641
- Shanklin J, Whittle E, Fox BG (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochem* 33:12787–12794
- Shi J, Cao Y, Fan X, Li M, Wang Y, Ming F (2012) A rice microsomal delta-12 fatty acid desaturase can enhance resistance to cold stress in yeast and *Oryza sativa*. *Mol Breed* 29(3):743–757
- Vander Zwan C, Brodie SA, Campanella JJ (2000) The Intraspecific

- phylogenetics of *Arabidopsis thaliana* in worldwide populations. *Systematic Botany* 25:47-59
- Waraich EA, Ahmed Z, Ahmad R, Ashraf MY, Naeem MS, Rengel Z (2013) *Camelina sativa*, a climate proof crop, has high nutritive value and multiple-uses: a review. *Aust J Crop Sci* 7:1551-1559
- 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(3):367-372
- Zhang M, Fan J, Taylor DC, Ohlrogge JB (2009) DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell* 21:3885-3901
- 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. *The Plant J* 19:645-653