

고도불포화지방산 생합성: 식물에서의 대사공학적 응용

김순희 · 김소연 · 김종범 · 노경희 · 김영미 · 박종석*

농촌진흥청 국립농업과학원 기능성물질개발과

Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids: Metabolic Engineering in Plants

Sun-Hee Kim, So-Yun Kim, Jong-Bum Kim, Kyung-Hee Roh, Young-Mi Kim, and Jong-Sug Park*

Functional Bio-Material Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

Received July 6, 2009; Accepted July 29, 2009

Polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) have significantly beneficial effects on health in relation to cardiovascular, immune, and inflammatory conditions and they are involved in determining the biophysical properties of membranes as well as being precursors for signaling molecules. PUFA biosynthesis is catalyzed by sequential desaturation and fatty acyl elongation reactions. This aerobic biosynthetic pathway was thought to be taxonomically conserved, but an alternative anaerobic pathway for the biosynthesis of PUFA is now known to contain analogous polyketide synthases (PKS). Certain fish oil can be a rich source of PUFA although processed marine oil is generally undesirable as food ingredients because of the associated objectionable flavors that are difficult and cost-prohibitive to remove. Oilseed plants contain only the 18-carbon polyunsaturated fatty acid alpha-linolenic acid, which is not converted in the human body to EPA and DHA. It is now possible to engineer common oilseeds which can produce EPA and DHA and this has been the focus of a number of academic and industrial research groups. Recent advances and future prospects in the production of EPA and DHA in oilseed crops are discussed here.

Key words: desaturation, DHA, EPA, fatty acyl elongation, oilseed crops, polyunsaturated fatty acids

서 론

ω 6 및 ω 3 계통의 고도불포화지방산(Polyunsaturated fatty acids: PUFA)인 arachidonic acid(ARA, C20:4 ω 6)와 eicosapentaenoic acid(EPA, C20:5 ω 3), docosahexaenoic acid(DHA, C22:6 ω 3)는 동물 세포막의 필수 구성성분으로 phosphatidylcholine과 결합한 형태로 세포막의 인지질 층에 삽입되어 세포막의 유동성을 좋게 하고[Stillwell과 Wassall, 2003], 혈중 콜레스테롤을 감소시키며, 암 증식을 억제하는 등의 질병 예방 효과가 뛰어나다[Crawford 등, 1997; Benatti 등, 2004]. 특히 DHA는 뇌 기능 강화와 기억력 증진을 통한 영, 유아의 뇌 기능 성장발달과 학습기능 향상[Benatti 등, 2004], 통증을 알려주는 prostaglandin과 같은 호르몬의 전구체로서 호르몬 조절 작용 등의 중요한 기능이 규명되었으며[Heird과 Lapillonne,

2005; Marszalek과 Lodish, 2005], 최근 식품첨가제와 화장품 원료 및 의약품 분야에서 큰 시장을 형성하고 있다.

포유동물은 ω 6/ Δ 12 및 ω 3/ Δ 15 desaturase가 발현되지 않아 PUFA의 de novo 합성을 할 수 없으며[Truksa 등, 2006], 정상적인 성장과 발달을 위하여 linoleic acid(LA, C18:2 ω 6)와 α -linolenic acid(ALA, C18:3 ω 3)를 반드시 식물로 섭취해야만 한다(Fig. 1). DHA는 주로 참치와 같은 등 푸른 생선으로부터 생산하고 있으나, 다량의 DHA를 식품에 첨가하게 되면 물고기 특유의 비린내 때문에 상품성에 문제가 되어 그 냄새를 제거하기 위한 순수 분리, 정제가 관건이 되고 있다[Domergue 등, 2005]. 해양 조류를 통해서도 DHA 생산이 가능하나, 낮은 성장률로 말미암아 DHA의 대량 생산을 위해서는 고가의 장비를 필요로 한다. 최근 이러한 문제점들을 해결하고 저비용 고효율의 DHA를 생산하고자 식물 종자에서의 발현 시스템을 이용한 PUFA 생산에 대한 관심이 높아지고 있다[Singh 등, 2005; Truksa 등, 2006; Graham 등, 2007; Damude와 Kinney, 2008].

PUFA은 전구체인 LA와 ALA(Fig. 1)로부터 일련의 불포화(desaturation)와 2탄소 사슬 연장(elongation) 과정을 통해 생

*Corresponding author
Phone: +82-31-299-1624; Fax: +82-31-299-1622
E-mail: jongsug@korea.kr

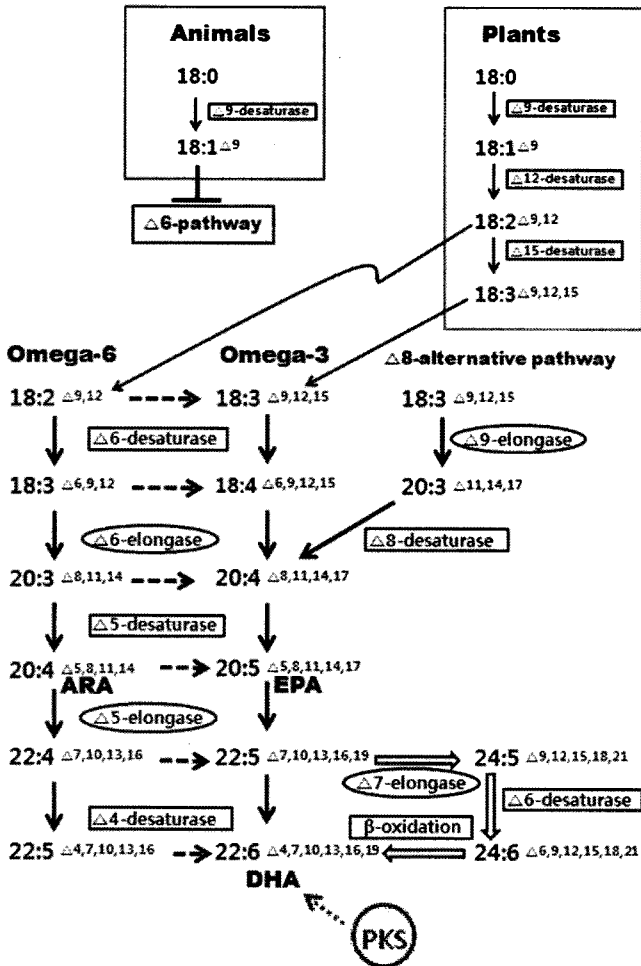


Fig. 1. The alternative PUFA biosynthesis pathway in high and lower eukaryotes. The various routes for synthesis of arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) are shown, as mediated by the enzyme activities (desaturases, elongases). The predominant Δ6-pathway (via the Δ6-desaturase) is shown, as is the alternative Δ8-pathway.

합성 된다. 식물은 PUFA를 생합성 하지 못하며, LA와 ALA로부터 PUFA를 생합성 하기 위해서는 Δ6 desaturase(Δ6DES), Δ6 elongase(Δ6ELS), 그리고 Δ5 desaturase(Δ5DES)의 도입이 필요하다. 따라서, 고 함량의 PUFA를 축적하는 해양 미생물, 조류 혹은 어류 유래의 지방산 불포화 효소 및 2탄소 사슬 연장 효소 유전자를 식물 종자 특이적으로 발현시키는 대사공학적인 방법을 이용하여 얻을 수 있다.

현재까지 자연계에는 3 종류의 PUFA 생합성의 경로가 알려져 있다[Qiu, 2003]. (1) 물 곰팡이류에 속하는 *Saprolegnia*는 진균물질인 ALA에 대하여 Δ6 desaturation, elongation 및 Δ5 desaturation 반응을 통하여서 EPA를 합성하는 경로를 이용하는 반면[Pereira 등, 2004a], (2) *Euglena* 등의 원생생물은 Δ9 elongation, Δ8 desaturation 및 Δ5 desaturation에 의해 EPA를 생합성 한다[Wallis과 Browse, 1999](Fig. 1). 위의 두 경로를 통해서 생합성 된 EPA는 Δ5 elongation과 Δ4 desaturation에 의해 최종적으로 DHA를 생합성 한다[Pereira 등, 2004b]. 포유 동물은 EPA로부터 4단계의 더 복잡한 경로 즉, β-oxidation 에

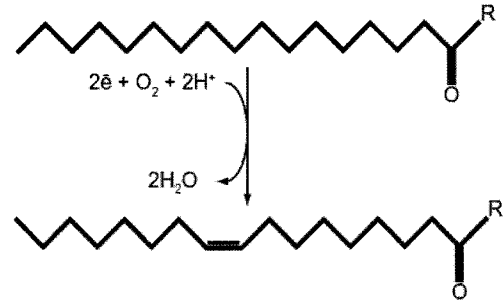


Fig. 2. Reactants and products of a representative fatty acid desaturase. This is a 2e and O₂-dependent dehydrogenation at an unactivated position of the fatty acyl chain, resulting in a cis-double bond formation. For acyl-CoA desaturases, R is CoA; for acyl lipid desaturase, R is a phospholipid.

의한 역전환(retro-conversion) 과정을 거쳐 DHA를 생합성 하게 된다[Sprecher 등, 1995; Wallis 등, 2002](Fig. 1). (3) 해양 조류(*Schizochytrium*)와 해양 미생물(*Shewanella*)은 polyketide synthase(PKS) 경로를 이용하여 DHA를 생합성 한다[Metz 등, 2001]. PKS 경로는 앞의 두 PUFA 생합성 경로에 필수적인 수종의 desaturase와 elongase 대신에, 3-ketoacyl synthase, 3-ketoacyl reductase, acyl carrier protein, chain length factor 그리고 acyl transferase와 같은 PKS의 합성 도메인을 하나의 유전자 집단(gene cluster)으로 구성하고 있어 PUFA 생합성 하는데 필요한 반응 횟수를 줄일 수 있다. 이러한 해양 생물들은 육상 식물들의 PUFA 생합성 경로를 재구성하는데 필요한 유용한 유전자원으로 활용할 경우 주로 생선을 통해서만 섭취하던 EPA와 DHA를 식물을 통해서 섭취할 수 있는 유전공학적인 기반을 구축할 수 있다.

본 론

PUFA 생합성 관련 효소

Desaturase. PUFA는 LA와 ALA로부터 지방산 desaturase와 acyl-CoA elongase에 의해 생합성 된다[Okayasu 등, 1981; Sprecher, 1999]. Desaturase는 acyl chain(R-CO-)에 있는 methylene 기(-CH₂-)에서 두 개의 수소 원자를 이탈시켜 이중결합을 형성함으로써 지방산을 불포화 상태로 만들며 형성된 이중결합의 대부분은 시스(cis-) 형태로 지방산 사슬에 비틀림을 형성하여 막의 유동성과 투과성을 좋게 한다(Fig. 2). 이 때 이중결합의 위치는 활성화된 desaturase에 의해 위치 의존적으로 생성된다. Δ desaturase 단백질의 N-말단에 cytochrome b5-도메인이 있는 front-end desaturase로서 지방산의 carboxyl기로부터 시작하여 특정 위치에 이중결합을 형성한다[Aitzemuller 등, 1994](Fig. 1). Desaturation 반응을 위해서는 O₂, NAD(P)H, 전자전달시스템(ferredoxin-NADH reductase와 ferredoxin, 혹은 cytochrome b5와 cytochrome b5 reductase) 그리고 종결 desaturase가 필요하다[Schroepfer 등, 1965; Strittmatter 등, 1974; Thiede 등, 1985]. Desaturase는 soluble form과 membrane-bound form으로 존재한다. (1) Acyl carrier protein(ACP) desaturase는 soluble form으로서 식물의 plastid에 존재하며

Table 1. Some cloned genes involved in PUFA biosynthesis

Source organism	Regio-specificity	GenBank™ Accession No.	References
Desaturase			
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	Δ5	AY082392	Broker <i>et al.</i> , 1991
<i>Mortierella alpina</i>	Δ5	AF172755	Knutzon <i>et al.</i> , 1998
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Δ5	AY078796	Michaelson <i>et al.</i> , 1998
<i>Homo sapiens</i>	Δ5	AF226273	Cho <i>et al.</i> , 1999
<i>Rattus norvegicus</i>	Δ5	AB052085	Zolfaghari <i>et al.</i> , 2001
<i>Physcomitrella patens</i>	Δ6	CAA11033	Gerke <i>et al.</i> , 1998
<i>Ceratodon purpureus</i>	Δ6	CAB94993	Sperling <i>et al.</i> , 2000
<i>Homo sapiens</i>	Δ6	NP-004256	Marquardt <i>et al.</i> , 2000
<i>Borago officinalis</i>	Δ6	AAC49700	Beaudoin <i>et al.</i> , 2000
<i>Mortierella alpina</i>	Δ6	AF1101510	Huang <i>et al.</i> , 1999
Zebrafish	Δ5/Δ6	AF309556	Hastings <i>et al.</i> , 2001
<i>Helianthus annuus</i>	Δ12	AF251842	Martinez-Rivas <i>et al.</i> , 2001
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	Δ12	AY165023	Domergue <i>et al.</i> , 2003b
<i>Calendula officinalis</i>	Δ12	AY343065	Qiu <i>et al.</i> , 2001
<i>Arabidopsis (FAD3)</i>	ω3	NM_128552	Browse <i>et al.</i> , 1993
<i>Arabidopsis (FAD7)</i>	ω3	NM_111953	Iba <i>et al.</i> , 1993
<i>Arabidopsis (FAD8)</i>	ω3	NM_120640	McConn <i>et al.</i> , 1994
Elongase			
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Δ6/Δ5	AY605100	Meyer <i>et al.</i> , 2004
<i>Physcomitrella patens</i>	Δ6	DD087812	Domergue <i>et al.</i> , 2005
<i>Isochrysis galbana</i>	Δ9	DD087935	Lerchl <i>et al.</i> , 2004

NADPH와 O₂를 필요로 하고 ferredoxin-NADPH reductase와 ferredoxin이 작용할 수 있는 D/EXXH 모티프를 가지고 있다. (2) Membrane-bound form에는 두 종류가 존재한다. Acyl lipid desaturase는 cyanobacteria thylakoid, 식물의 endoplasmic reticulum(ER) 및 plastid에 존재하며 ferredoxin(cyanobacteria와 plastid) 혹은 cytochrome b5(ER)를 전자전달자로 사용하여 monogalactosyldiacylglycerol (cyanobacteria와 plastid)와 phosphatidylglycerol(plastid)에 있는 stearic(C18:0)과 oleic (C18:1 ω9) acyl 그룹을 불포화시킨다. 식물의 ER desaturase는 대부분 phosphatidylcholine에 있는 지방산을 이용한다. Acyl-CoA desaturase는 ER membrane에 존재하고 fatty-acyl-CoA를 기질로 사용하며 cytochrome b5가 전자전달자로서 작용한다. Fungi와 insect, nematodes 뿐만 아니라 모든 mammalian desaturase는 acyl-CoA desaturase이다.

Membrane-bound desaturase에는 두 개의 긴 hydrophobic domain이 존재하고 있어 막 이중 층에 걸쳐 있으며, 8개의 histidine잔기를 포함하는 His-box(HX3-4H, HX2-3HH, 그리고 H/QX2-3HH)가 잘 보존되어 iron의 리간드로서 desaturase의 촉매 중심역할을 한다. 지난 십여 년간, PUFA를 생산하는 다양한 유기체들로부터 분리한 desaturase 유전자 군에 대해 효모 혹은 식물에서의 발현을 통하여 특성이 규명되어 왔다(Table 1).

Delta-6 desaturase(D6DES). Membrane-bound desaturase인 D6DES는 *Synechocystis*로부터 처음 발견된 이래로 *Borago officinalis*와 *Caenorhabditis elegans*, humans, mice, rats에서 염기서열상의 상동성 등을 이용하여 추가 분리되었다(Table 1). D6DES는 기존의 이중결합과 지방산의 카르복실기(front) 말단 사이에 새로운 이중결합을 합성하는 front-end desaturase 로서

heme-binding 모티프를 갖는 amino-terminal cytochrome b5 도메인을 가지고 있다. *Borago officinalis* D6DES는 acyl-lipid desaturase로서 기질로 phosphatidylcholine에서 linoleate을 사용하는 반면, 많은 종들의 D6DES는 acyl-CoA desaturase로 존재한다. D6DES는 membrane-spanning domain을 가지는 membrane-anchored desaturase로서, 3개의 His-box 중 첫 번째 His 잔기들(HXXH)이 Glutamine(QXXHH)으로 대체되는 특징을 보인다.

Delta-5 desaturase(D5DES). D6DES와 elongase에 의한 desaturation 및 elongation 단계를 거친 후, PUFA 생합성을 수행하는데 필요한 D5DES는 동물에 존재하며 PUFA 합성을 20 개 탄소사슬을 가진 C20:3 ω6와 C20:4 ω3 지방산의 Δ5 위치에 또 하나의 이중결합을 형성한다. D5DES 유전자들은 humans, rats, 그리고 *C. elegans*을 포함한 여러 동물에서 발견되었다(Table 1). Human의 경우 D5DES 유전자는 D6DES 유전자와 61% 아미노산 상동성을 보이며, D6DES에 존재하는 구조적 특징을 모두 가지고 있다.

Delta-5/6 desaturase(D5/6DES). Hastings 등 (2001)은 human의 D5DES 및 D6DES와 각각 58% 및 64%의 상동성을 보이는 Δ5/Δ6 DES를 Zebrafish (*Danio retio*)로부터 분리한 후 (Table 1), 효모에서 발현 시킨 결과 linoleic (C18:2 ω6)와 α-linolenic (C18:3 ω3) acid가 18:3 ω6과 18:4 ω3으로 동시에 전환되어 ARA와 EPA를 생산함을 확인하였다. 이러한 Δ5/Δ6 bifunctional desaturase의 기능은 Δ5와 Δ6 desaturase가 동일한 조상으로부터 유래했음을 보여준다.

Omega-3 desaturase (ω3DES) ω3 desaturases는 지방산의 methyl기 말단으로부터 3번째와 4번째 탄소 사이에 이중결합을

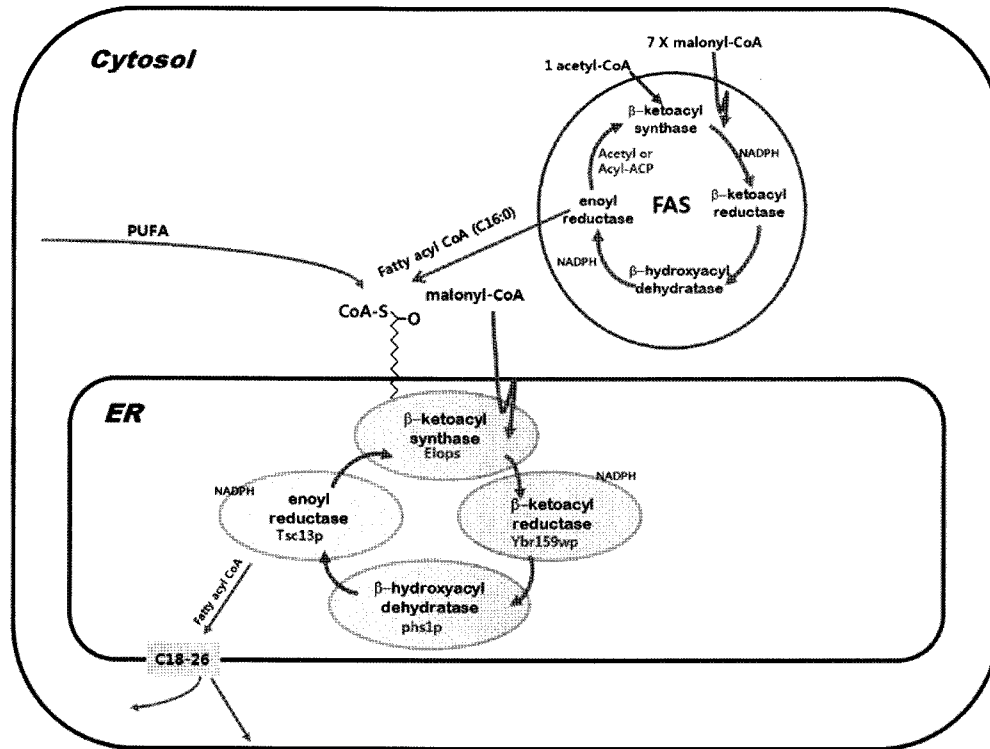


Fig. 3. Two enzyme complexes for fatty acid synthesis. Fatty acid synthesis is accomplished with the fatty acyl substrate covalently attached to a sulfhydryl group of the acyl carrier protein of the fatty acid synthase complex. Synthesis are performed by β -ketoacyl synthase, β -ketoacyl reductase, β -hydroxyacyl dehydratase, and enoyl reductase, leading to a fully saturated acyl-ACP. The synthase of PUFA is found in the endoplasmic reticulum and also performs a similar reiterative cycle of fatty acid synthesis (called elongation) using malonyl-CoA and acyl-CoA as substrates. PUFA synthase does not need an acyl carrier protein. The different β -ketoacyl synthases involved in PUFA synthesis, called Elops, determine the length of the final fatty acyl-CoA product. The yeast Elops are Elo1p, Fen1p, and Sur4p; the β -ketoacyl reductase is Ybr159wp; the β -hydroxyacyl dehydratase is Phs1p; and the enoyl reductase is Tsc13p.

형성한다. ω 3DES는 membrane-bound desaturase로서 3개의 His-box를 가지며 다른 acyl-lipid desaturase와 마찬가지로 ferredoxin(plastid) 혹은 cytochrome b5(plant ER)을 필요로 한다. 포유동물의 경우 ω 3DES를 가지고 있지 않으므로 반드시 ω 3 PUFA를 음식물로 섭취해야 한다. Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803의 *desB* 유전자에 의해 코딩 되는 ω 3DES는 plastid에 존재하는 것으로 알려졌으며 glycerolipids의 sn-1 위치에서 에스테르화된 18:2 n-6에 이중결합을 형성한다. *Arabidopsis*에는 3 종류의 ω 3 DES (FAD3, FAD7 그리고 FAD8)가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, FAD3는 ER에 위치하고 중심기질로서 phosphatidylcholine을 사용하여 18:2 n-6을 ω 3 위치에 이중결합을 형성해 18:3 n-3을 형성한다. FAD7과 FAD8은 chloroplasts에 존재하고 glycolipid-bound 16:2 n-6과 18:2 n-6을 16:3 n-3과 18:3 n-3으로 desaturate한다. Nematode *C. elegans*의 *fat-1*은 ω 3 desaturase을 코딩하며, 식물과 nematode ω 3 desaturase는 n-6 이중결합을 갖는 기질을 우선 사용한다.

Elongase(ELO). PUFA는 *E. coli*를 비롯한 원핵생물들의 혐기적인 생합성[Bloch, 1969]을 제외하고는, 진핵생물, 원시세균 그리고 일부 *Bacillus* 등은 호기성 환경조건하에서 elongation과 desaturation 반응에 의해 ER에서 생합성 된다[Bloomfield 과 Bloch, 1960; Fulco, 1974]. Elongation은 β -keto-acyl-CoA synthase(KS), ketoacyl-CoA reductase(KR), hydroxyacyl-CoA

dehydratase(HD), 그리고 enoyl-CoA reductase(ER)의 일련의 효소 반응에 의해 이루어진다[Jenni 등, 2007; Lomakin 등, 2007](Fig. 3). 전구체인 acyl-CoA가 malonyl-CoA와 KS 효소 작용에 의해 축합 반응이 일어나며, 축합된 기질 물질은 KR의 효소와 NAD(P)H 조효소의 도움으로 수소 원자가 첨가되면서 환원상태로 된다. 환원된 물질은 다시 HD 효소에 의해 물 1분자가 빠져 나가고 enoyl 상태의 산물을 생산하고, ER 환원효소에 의해 환원되면서 결과적으로 2개의 탄소 사슬이 연장된 지방산을 합성하게 된다. Cytoplasm에 존재하는 이들 지방산 생합성 효소(fatty acid synthase, FAS)는 homodimer이며, 다기능성 복합체로서의 기능을 갖는다. Cytosol에서 생성된 지방산(C16, C18)은 ER에서 각각의 막 결합효소들에 의해서 다시 4단계의 생합성 경로를 거치는 동안 탄소 사슬이 연장되어 PUFA를 합성 한다[Nugteren, 1965](Fig. 3).

PUFA의 탄소 사슬 연장에 관여하는 유전자들과 효소들이 식물을 포함한 여러 모델 시스템에서 연구되었으며(Table 2), 이들 유전자들과 효소들은 서로 다른 지방산 기질에 대하여 특이적으로 작용하는 것으로 알려졌다. *A. thaliana*유래의 membrane-bound fatty acid elongase 1(FAE1)는 이중결합이 1개 존재하는 erucic acid(C22:1 ω 9)를 합성하는데 관여하는 것으로 밝혀졌으며[James 등, 1995], 최근에는 PUFA를 생합성 하는데 필요한 ER 막 단백질 유전자들에 대한 특성이 효모에서 규명되었다. YBR159 ω 는 두 번째 과정에 사용되는 β -ketoacyl reductase인

Table 2. A list of the various members of the elongase family

Genes	Source	Alternate names	Conversion	Amino acids	Accession number
FAE1	<i>A. thaliana</i>		C22 MUFA	546	NM_119617
ELO1	<i>S. cerevisiae</i>		C14 to C16	310	NP_012339
ELO2	<i>S. cerevisiae</i>	GNS1, FEN1	Up to C24 SFA/MUFA	347	NP_009963
ELO3	<i>S. cerevisiae</i>	SUR4	Essential for C24 to C26	345	NP_013476
ELOVL1	Human	ELG1	GLA, ARA, ALA, EPA	279	XP_002040
ELOVL2	Human	ELG3	C20 and C22 PUFA	296	NP_060240
ELOVL3	Human	Cig30, ELG6	GLA, ALA	270	AAG117875
ELOVL4	Human		C20 and C22 PUFA	314	NP_073563
ELOVL5	Human	HELO1	GLA, ARA, STA, EPA, ALA	299	NP_068586
LCE	Human	FACE	C12-C16 SFA/MUFA	265	NP_076995
ELG4	Human		GLA, ARA, ALA, EPA	281	NP_079206
Elov11	Mouse	Ssc1	Broad SFA/MUFA to C24	279	NP_062295
Elov12	Mouse	Ssc2	C20 and C22 PUFAs	292	NP_062296
Elov13	Mouse	Cig30		271	NP_031729
Elov14	Mouse			312	AAG47667
Lce	Mouse	FACE	C12-C16 SFA/MUFA	267	AY053453
rELO1	Rat		C16-C20 MUFA/PUFA	299	NP_599209
rELO2	Rat		C16 and C18 SFA/MUFA	267	BAB69888
CEELO1	<i>C. elegans</i>		C16 MUFA/C18 PUFA	288	AF244356
GLELO	<i>M. alpine</i>		GLA, STA	318	AAF70417
MAELO	<i>M. alpine</i>			317	AAF71789
IgASE1	<i>I. galbana</i>		LA, ALA	263	AF390174
PSE1	<i>P. patens</i>		GLA, STA	290	AF428243

Source of origin of these proteins is indicated, as well as the substrate specificity, protein length, and NCBI accession number

것으로 알려졌으며, *S. cerevisiae*에서 외래 유전자를 발현시켜 탄소사슬을 연장시키는 Ybr159p는 필수적인 역할을 수행하고 Tsc13p는 효모의 생존에 필수적인 enoyl reductase로서 지방산 탄소 사슬 연장 과정 중 마지막 과정에 관여 한다[Kohlwein 등, 2001; Beaudoin 등, 2002; Han 등, 2002]. Fen1p와 Sur4p는 Elops라고 불리는 또 다른 이름으로서[Oh 등, 1997] 지방산 탄소사슬 연장과정의 첫 번째 축합단계에 사용되는 효소이다[Moon 등, 2001; Paul 등, 2006; Westerberg 등, 2006]. 효모에서 Elop의 유사 유전자의 이형발현을 시도했을 때, 서로 다른 유기체와 세포 유형에 따라서 PUFA의 탄소 사슬 연장이 매우 다양하게 나타났다 [Leonard 등, 2004; Jakobsson 등, 2006; Denic 과 Weissman, 2007].

Polyketide PUFA 생합성 효소. Acetyl-CoA로부터 DHA (C22:6)가 생합성 되기까지 30개 이상의 특정 효소들의 활성화와 지방산 생합성의 순환적인 경로가 70번 정도 반복적으로 일어난다. 그러나 자연계에서는 이러한 과정을 효과적으로 수행하기 위하여 다른 경로를 통한 PUFA 생합성이 수행되기도 한다. 해양 미생물과 *Schizochytrium*(원생생물) 등은 polyketide synthase(PKS)를 이용하여 PUFA 생합성을 하게 되는데, PKS 생합성은 지방산 생합성과 동일한 4개의 효소 반응을 이용하나 다양한 탄소 사슬을 만들어 내기 때문에 반복되는 순환경로는 훨씬 적은 특징이 있다. PKS 생합성을 통하여 다양한 케토 ((C=O)_n) 및 하이드록시 (C-OH) 그룹과 탄소와 탄소간의 이중 결합이 이루어지며, PKS는 다기능 단백질 복합체로서 연속적인 축합반응에 관여하는 여러 개의 모듈로 구성되어 있다. 즉, 축합반응(ketoacyl-ACP synthase, KS 도메인), acyl CoA:ACP

전이 반응(acyl CoA-ACP transacylase, AT), 여러 개의 acyl carrier protein 도메인(ACP), ketoacyl 환원 반응(ketoacyl-ACP reductase, KR), 탈수소효소/이성질체 반응(hydroxyacyl-ACP dehydrase/isomerase, DH/I), enoyl 환원 반응(enoyl reductase, ER)에 관여하는 효소들로 구성되어 있다(Fig. 4).

EPA 생합성 관련 분자 유전학적 접근은 해양 미생물 *Shewanella putrefaciens* SCRC 2738(U73935)[Yazawa, 1996] 유래의 게놈 단편(38kb) 분석으로부터 시작되어 EPA 생합성에 관련된 유전자군(ORFs 2, 5, 6, 7 및 8)을 *E. coli*, 해양 원시 세균 및 *Synechococcus sp.*에서 발현시켜 EPA의 생성을 확인 하였다[Takeyama 등, 1997]. 해양 미생물 (*P. profundum*. SS9, *Shewanella*, *M. marina*)과 *Schizochytrium* 유래의 ω3 생합성 관련 유전자 집단을 비교한 경우 높은 상동성을 보였다(Fig. 5) (AF409100 (SS9); U73935 (*Shewanella*); 그리고 AB025342 (*M. marina*)) [Allen 과 Bartlett, 2002]. *P. profundum*. SS9와 *Shewanella*(EPA 생산), 그리고 *M. marina*와 *Schizochytrium* (DHA 생산) 등은 반복되는 ACP domain의 존재여부가 생합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(Fig. 5). ACP는 desaturation과 acyl-transferase reactions 뿐만 아니라 모든 지방산 생합성 반응에서 acyl기를 전달해주는 중요한 역할을 수행 하는데, *P. profundum*. SS9와 *Shewanella sp.*, *Moritella*, *Schizochytrium*에는 각각 5, 6, 5, 그리고 9개 ACP 도메인이 존재하는 것으로 밝혀졌다[Metz 등, 2001]. 단일 acyl chain에 산소의 공급 없이 여러 개의 이중결합을 생성하는 측면에서 PKS 경로는 지방산의 desaturase 체계와는 큰 차이가 있으며, 이러한 능력은 혐기성 미생물에 있는 DH/I 도메인의 활성화에 의

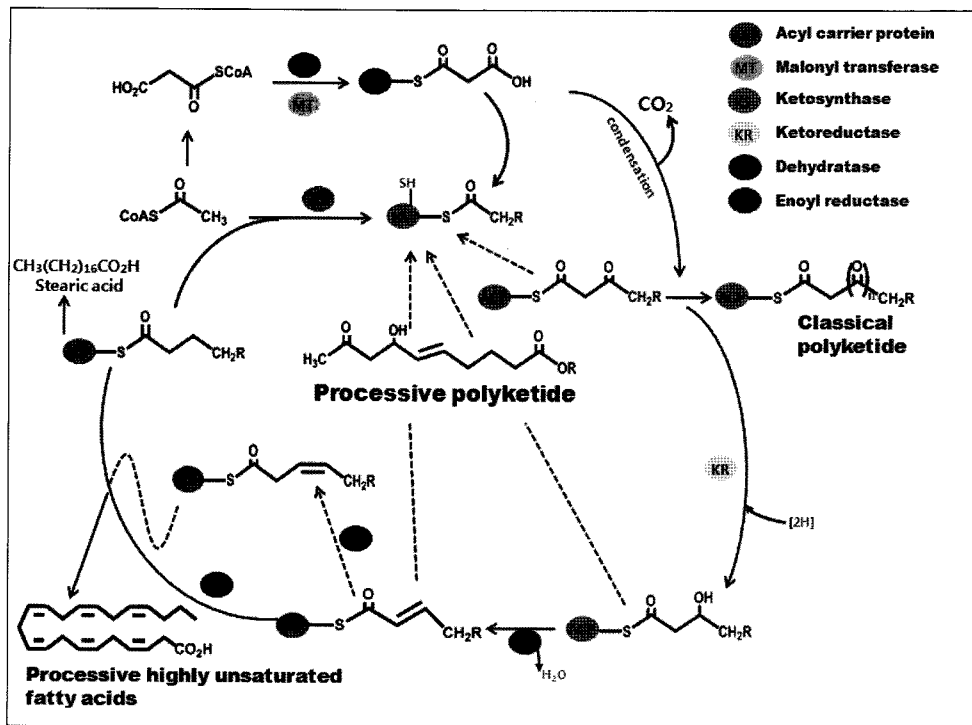


Fig. 4. The scheme for the processive synthesis of polyunsaturated fatty acids (PUFA) by a polyketide synthase (PKS) system. In the case of PUFAs, it is envisaged that a primer molecule (in the form acetyl-CoA) undergoes several rounds of sequential reactions (keto-synthase, ketoreductase, dehydratase and enoyl reductase), resulting in repeated synthesis and fatty acyl chain (esterified to the acyl carrier protein) elongation by two carbons per cycle. Because PUFAs contain methylene-interrupted double bonds (i.e. at the third carbon), it is likely that a dehydratase (DH) module in the PKS also simultaneously carries out a *trans-cis* isomeration to generate this configuration.

한 것으로 알려졌다(미생물 PfaC와 *Schizochytrium* ORF C)[Valentine 등, 2004].

대사공학. 등 푸른 생선은 PUFA를 제공하는 중요한 자원이지만 공급량에는 한계가 있어 이를 대체할 만한 자원의 필요성이 대두되고 있다. 따라서 우리가 재배하는 유지작물을 대상으로 대사공학적 접근을 통하여 PUFA를 생산하고자 하는 노력이 최근 활발히 시도되고 있다. 고등 식물들은 C18-PUFA 인 LA와 ALA, 그리고 약간의 GLA와 SDA (stearidonic acid, C18:4)를 생합성할 수 있으나, 이보다 탄소 사슬이 더 길고 이중결합이 3개 이상인 PUFA는 생산하지 못한다. 따라서, 고등 식물에서 PUFA를 생합성 하기 위해서는 PUFA를 합성하는 것으로 알려진 곰팡이류(fungi), 이끼류(mosses), 조류(algae), 곰팡이류 원생생물(thraustochytrids), 그리고 해양 미생물(marine bacteria)등으로부터 PUFA 생합성 관련 유전자를 분리하여 식물체 내에서 발현시키는 유전공학적인 방법을 이용하고 있다. 식물에서 PUFA 관련 이형 유전자의 성공적인 발현은 *Arabidopsis*에서 처음으로 이루어졌다[Qi 등, 2004](Table 1). 조류인 *Isochrysis galbana* 유래의 $\Delta 9$ elongase, 원생생물인 *Euglena gracilis* 유래의 $\Delta 8$ desaturase, 그리고 곰팡이인 *M. alpina* 유래의 $\Delta 5$ desaturase를 동시 발현시켜 $\Delta 8$ -alternative pathway(Fig. 1)를 통한 PUFA 생합성 결과 *Arabidopsis* 앞에서 7%의 ARA와 3%의 EPA가 생합성 됨을 확인하였다. 이 실험을 통하여 Qi는 식물 시스템을 이용한 경제성 있는 PUFA 생산을 위해서 종자 특이적으로 발현시킬 필요성을 제시하였다.

Abbadi 등[2004]은 *Physcomitrella patens*와 *Borago*

officinalis 유래의 $\Delta 6$ desaturases, *P. patens*와 *Caenorhabditis elegans* 유래의 $\Delta 6$ elongases, 그리고 *M. alpina*와 *P. tricorutum* 유래의 $\Delta 5$ desaturase 유전자들을 담배(*Nicotiana tabacum*)와 아마(*Linum usitatissimum*)에서 종자 특이적으로 발현시킨 결과, 소량의 ARA와 EPA가 종자에 축적됨을 확인하였다. 또한 형질 전환 식물의 C18 전구체로부터 C20 PUFA의 낮은 생합성 효율은 acyl-CoA pool의 기질 부족 때문이며, 형질전환 종자에서 분리한 acyl-CoA와 malonyl-CoA를 마이크로솜(microsomes)과 함께 반응시킬 경우 효과적으로 탄소 사슬이 연장되었음을 확인하였다. 이러한 결과는 효모에서 관찰된 예[Domergue 등, 2003a]에서와 마찬가지로 PUFA의 불포화화 산물이 탄소 사슬 연장되기 위해서는 충분한 acyl-CoA pool이 필요함을 뒷받침하며, 따라서 우선적으로 해결되어야 할 부분은 acyl-CoA로부터 불포화화 지방산이 빠르게 분리되어 triacylglycerols(TAGs) 합성에 이용되도록 하여야 한다[Abbadi 등, 2004]. 식물체에서의 DHA 합성 시도는 Kinney 등[2004]에 의해서 처음 시도되었다. 대두의 somatic embryo에서 *M. alpina*의 $\Delta 6$ desaturase, $\Delta 5$ desaturase 그리고 $\Delta 6$ elongase, *Saprolegnia diclina*의 $\Delta 17$ desaturase, *Schizochytrium aggregatum*의 $\Delta 4$ desaturase, 그리고 *Pavlova salina*의 $\Delta 5$ elongase 등 6개 유전자들을 발현시켜 3%수준의 DHA가 생합성 됨을 확인하였다. *Brassica juncea*에서는 9종의 유전자를 발현시킴으로써 DHA가 생합성 됨을 확인 하였다[Wu 등, 2005]. 처음에는 *B. juncea*에 대하여 C20 PUFA 생합성하기 위하여 *Pythium irregulare* 유래의 $\Delta 6$ desaturase, *P. patens* 유래의 $\Delta 6$ elongase 그리고 *Thraus-*

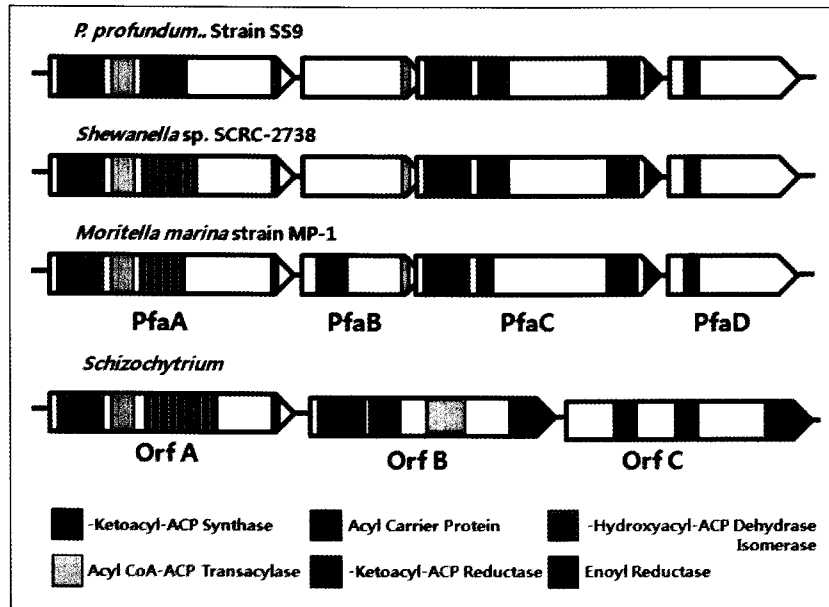


Fig. 5. Omega-3 gene clusters and enzyme domains of the anaerobic pathway from three marine microbes and one protist isolates. Omega-3 polyunsaturated fatty acid biosynthesis involves large multiple domain proteins. The cluster labeled SS9 and Shewanella are EPA genes, whereas M. marina and Schizochytrium are a DHA strain. Note the strong similarities between EPA and DHA gene clusters.

tochytrium 유래의 Δ5 desaturase 유전자를 형질전환한 결과 종자에서 약 7% 수준의 ARA와 소량의 EPA가 축적됨을 확인하였다. 이 형질전환체에 *Calendula officinalis* 유래의 Δ12 desaturase를 추가 발현시킨 결과 종자에 약 12% 수준의 ARA가 축적되었고, 또한 *Phytophthora infestans* 유래의 ω3 desaturase를 추가 발현시킨 결과, 축적된 ARA가 EPA로 전환되어 약 8% 수준의 EPA가 생합성 되었다. 생합성 된 EPA는 *Thraustochytrium* 유래의 Δ5 desaturase와 lysophosphatidyl acyltransferase 그리고 *O. mykiss* 유래의 Δ5 elongase를 발현시킴으로써 약 1.5% 수준의 DHA를 생합성 하였다.

최근 식물종자에서의 DHA 생합성이 *Arabidopsis*에서 보고되었다[Robert 등, 2005]. 어류 *Danio rerio* 유래의 Δ6/Δ5 desaturase와 *C. elegans* 유래의 Δ6 elongase를 *Arabidopsis*에서 동시에 발현시킨 결과 종자에서 약 1.6% 및 3.2% 수준의 ARA와 EPA가 각각 축적됨을 확인하였으며, 조류 *P. salina* 유

래의 Δ4 desaturase와 Δ5 elongase를 추가로 발현시킨 결과 약 0.2~0.5% 수준의 DHA가 생합성 됨을 확인하였다. 어류 유래의 Δ6/Δ5 desaturase는 동물 desaturase의 전형적인 형태인 acyl-CoA 기질에 작용하는 반면, 식물이나 조류 유래의 desaturase는 lipid와 결합된 기질과 작용한다. 따라서 식물에서 발현시킬 효소 유전자들을 선택할 때는 그 유전자가 발현될 최적의 효소 활성을 고려하여야 한다. PKS 유전자들을 발현시켜 PUFA가 성공적으로 생합성 된 예가 효모와 식물에서 최근 보고 되었다. Metz 등은(2006) *Schizochytrium* 유래의 DHA를 생합성 하는 PKS 효소 유전자 군과 PKS의 ACP 도메인을 활성화 시키는데 필수적인 phosphopantetheinyl transferase를 원시세균(*Nostoc*)으로부터 분리하여 *Brassica* 유래의 acyl-ACP thioesterase와 함께 색소체 특이적으로 *Arabidopsis*에서 동시 발현시킨 결과 약 1% 수준의 DHA와 2% 수준의 docosapentaenoic acid(DPA, C22:5) 이성질체가 종자에 축적됨을 확인하였으며,

Table 3. Appreciable progress made in identified genes involved in the biosynthesis of PUFAs

Species (organ)	Products	genes*	References
Yeast			
<i>Mortierella alpina</i>	GLA	Δ12,Δ6 desaturases	Huang <i>et al.</i> , 1999
<i>Mortierella alpina</i>	ARA and EPA	Δ6 elongase, Δ6, Δ5 desaturase	Beaudoin <i>et al.</i> , 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ARA	acyl-CoA, desaturase and elongase	Domergue <i>et al.</i> , 2003a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DHA	Δ6 elongase	Meyer <i>et al.</i> , 2004
Plants			
<i>Arabidopsis</i> (leaves)	ARA and EPA	Δ9 elongase and Δ8/Δ5 desaturases	Qi <i>et al.</i> , 2004
<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Linum usitatissimum</i> (seed)	ARA and EPA	Δ6 elongase and Δ6/Δ5 desaturases	Abbadì <i>et al.</i> , 2004
Soybean (embryos)	DHA	Δ6/Δ5 elongase, Δ17/Δ5/Δ4 desaturases	Kinney <i>et al.</i> , 2004
<i>Brassica juncea</i> (seed)	GLA, ARA, EPA and DHA	Δ6 elongase and Δ6/Δ5 desaturases	Wu <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis</i>	DHA	Δ6/Δ5/Δ4 desaturases and Δ6/Δ5 elongase	Robert <i>et al.</i> , 2005

*Δ(delta) is an indication that a carbon-carbon double bond is created at a designated position from the carboxyl group of a fatty acid.

또한 *Schizochytrium*의 acyl-CoA 생합성효소(ACSI과 ACSII)와 PKS/phosphopantetheinyl transferase를 동시에 발현시킴으로써 종실 내 지방산의 약 2.5%에 해당하는 DHA를 생합성 하는데 성공하였다. PKS 시스템을 이용한 PUFA 생산은 호기적 지방산 생합성에 비해 상대적으로 간단해 보여 대사 공학 측면에서는 대단히 유망한 대상이나, 아직까지도 최종 효소 산물에 대한 생화학적 의문점과, 세포막에 최종 산물의 적절한 부착 여부가 해결해야 할 숙제로 남아 있다.

국내에서도 주요 유지작물에서 고부가 PUFA를 대량 생합성 하기 위하여 농촌진흥청에서 추진 중인 어젠다 사업과제 중 「GLA등 불포화 유지생산을 위한 유전자 전환 작물 개발」을 국립농업과학원에서 수행하고 있는 중이며, 국내 고유의 해조류 및 어류로부터 PUFA 생합성 관련 유전자군을 분리한 후, 효모 시스템을 이용한 유전자 기능 검증결과 기질 특이적으로 PUFA 생합성에 활력을 보임을 확인하였다. 현재 유지작물에서 종실 특이적으로 다중 발현시켜 대량 PUFA 생합성을 시도하고 있으며, 형질전환 유지작물에 대하여 고 오일함량 및 스트레스 저항성 품종과 계통 간 교잡육종을 하면 실제 실용화가 가능한 고부가 유지작물을 생산할 것으로 기대하고 있다.

결 론

EPA와 DHA를 비롯한 PUFA는 질병예방 효과, 뇌 기능 강화 및 호르몬 조절작용 등 생리적으로 인간의 몸에 중요한 역할을 수행하며 식품, 화장품, 의약품시장에서 큰 비중을 차지하고 있다. 최근 대사공학적 접근을 통하여 PUFA 생합성하는 고부가 유지작물개발이 크게 주목받고 있으며, PUFA 생합성 관련 유전자들이 여러 해양생물을 중심으로 분리되어 식물에서 발현시킴으로써 새로운 지방산 생합성 경로를 통한 대량 PUFA 생합성의 발전가능성을 최근의 실험들을 통하여 확인하였다. 하지만, 유지작물에서의 EPA나 DHA생산은 시작단계에 불과하며, 기존의 해양생물 등을 통한 오일생산 수요량을 대처할 수 있도록 경제성을 가지기 위해서는 종자 오일중 EPA 및 DHA 비율을 10% 이상 차지하도록 하고, 전체 오일함량을 획기적으로 증대시키는 등 유전공학적 연구가 뒷받침되어야 한다. 기존 올레산 함유율이 낮은 대두(soybean)에 대하여 올레산 80% 이상 차지하도록 실용화시킨 최근의 대사공학 기술 수준 및 발전에 비추어보아, 머지않은 장래에 높은 함량의 EPA 및 DHA를 생산하는 작물을 식탁에서 쉽게 발견할 수 있을 것으로 기대된다. 인간의 평균 수명 연장과 건강한 삶에 대한 관심 증대에 따라 영양학적으로 중요한 PUFA 생합성 고부가 작물의 개발은 인간의 삶을 더욱 행복하게 만들어 줄 것이다. 따라서 실용화 및 산업화가 가능한 고부가 PUFA생합성 유지작물 개발을 위하여 최근의 PUFA 생합성 관련 유전자 개발과 이를 이용한 식물시스템에서의 대사공학적 연구현황을 고찰하였다.

Key words: 불포화, DHA, EPA, fatty acyl elongation, polyunsaturated fatty acids, 유지종자 작물.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다2 전략연구과제 “GLA등 불포화 유지생산을 위한 유전자 전환 작물 개발”(200901OFT1234753)과 농업공동연구개발과제 “바이오디젤 생산을 위한 원료작물 품종개발”(200901FHT020814284) 과제지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Abbadi A, Domergue F, Bauer J, Napier JA, Welti R, Zahringer U, Cirpus P, and Heinz E (2004) Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation. *Plant Cell* **16**, 2734-2748.
- Aitzetmuller K and Tsevegsuren N (1994) Occurrence of γ -linolenic acid in *Ranunculaceae* seed oils. *J Plant Physiol* **143**, 538-543.
- Allen EE and Bartlett DH (2002) Structure and regulation of the Omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *photobacterium profundum* strain SS9. *Microbiology* **148**, 1903-1913.
- Beaudoin F, Gable K, Sayanova O, Dunn T, and Napier JA (2002) A *Saccharomyces cerevisiae* gene required for heterologous fatty acid elongase activity encodes a microsomal beta-keto-reductase. *J Biol Chem* **277**, 11481-11488.
- Beaudoin F, Michaelson LV, Hey SJ, Lewis MJ, Shewry PR, Sayanova O, and Napier JA (2000) Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6421-6426.
- Benatti P, Peluso G, Nicolai R, and Calvani M (2004) Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr* **23**, 281-302.
- Bloch K (1969) Enzymatic synthesis of monounsaturated fatty acids. *Acc Chem Res* **2**, 193-202.
- Bloomfield DK and Bloch K (1960) Formation of ω ,9-unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **235**, 337-345.
- Broker M, Bauml O, Gottig A, Ochs J, Bodenbenner M, and Amann E (1991) Expression of the human blood coagulation protein factor XIIIa in *Saccharomyces cerevisiae*: dependence of the expression levels from hostvector systems and medium conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**, 756-764.
- Browse J, McConn M, James D Jr, and Miquel M (1993) Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of alpha-linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. *J Biol Chem* **268**, 16345-16351.
- Cho HP, Nakamura M, and Clarke SD (1999) Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem* **274**, 37335-37339.
- Crawford MA, Costeloe K, Ghebremeskel K, Phylactos A, Skirvin L, and Stacey F (1997) Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? *Am J Clin Nutr* **66**, 1032S-1041S.

- Damude HG and Kinney AJ (2008) Enhancing plant seed oils for human nutrition. *Plant Physiol* **147**, 962-968.
- Domergue F, Abbadi A, and Heinz E (2005) Relief for fish stocks: oceanic fatty acids in transgenic oilseeds. *Trends Plant Sci* **10**, 112-116.
- Domergue F, Abbadi A, Ott C, Zank TK, Zahringer U, and Heinz E (2003a) Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast. *J Biol Chem* **278**, 35115-35126.
- Domergue F, Spiekermann P, Lerchl J, Beckmann C, Kilian O, Kroth PG, Boland W, Zahringer U, and Heinz E (2003b) New insight into *Phaeodactylum tricornerutum* fatty acid metabolism: cloning and functional characterization of plastidial and microsomal $\Delta 12$ -fatty acid desaturases. *Plant Physiol* **131**, 1648-1660.
- Denic V and Weissman JS (2007) A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* **130**, 663-677.
- Fulco AJ (1974) Metabolic alteration of fatty acids. *Annu Rev Biochem* **43**, 215-240.
- Girke T, Schmidt H, Zahringer U, Reski R, and Heinz E (1998) Identification of a novel D6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J* **15**, 39-48.
- Graham IA, Larson T, and Napier JA (2007) Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates. *Curr Opin Plant Biol* **18**, 142-147.
- Han G, Gable K, Kohlwein SD, Beaudoin F, Napier JA, and Dunn TM (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* YBR159w gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *J Biol Chem* **277**, 35440-35449.
- Hastings N, Agaba M, Tocher DR, Leaver MJ, and Dick JR, et al. (2001) A vertebrate fatty acid desaturase with delta 5 and delta 6 activities. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14304-14309.
- Heird WC and Lapillonne A (2005) The role of essential fatty acids in development. *Annu Rev Nutr* **25**, 549-571.
- Huang YS, Chaudhary S, Thurmond JM, Bobik EG Jr, Yuan L, Chan GM, Kirchner SJ, Mukerji P, and Knutzon DS (1999) Cloning of $\Delta 12$ - and $\Delta 6$ -desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ -linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* **34**, 649-659.
- Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, Fuse T, and Nishimura M, et al. (1993) A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **268**, 24099-24105.
- Jakobsson A, Westerberg R, and Jacobsson A (2006) Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* **45**, 237-249.
- James Jr DW, Lim E, Keller J, Plooy I, Ralston E, and Dooner HK (1995) Directed Tagging of the Arabidopsis FATTY ACID ELONGATION1 (FAE1) Gene with the Maize Transposon Activator. *Plant Cell* **7**, 309-319.
- Jenni S, Leibundgut M, Boehringer D, Frick C, Mikolasek B, and Ban N (2007) Structure of fungal fatty acid synthase and implications for iterative substrate shuttling. *Science* **316**, 254-261.
- Kinney AJ, Cahoon EB, Damude HG, Hitz WD, Kolar CW, Liu ZB. August 10, 2004. Production of very long chain polyunsaturated fatty acids in oilseed plants. *International Patent Publication WO* 2004071467.
- Knutzon DS, Thurmond JM, Huang YS, Chaudhary S, Bobik EG Jr, Chan GM, Kirchner SJ, and Mukerji P (1998) Identification of $\Delta 5$ -desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Bakers' Yeast and Canola. *J Biol Chem* **273**, 29360-29366.
- Kohlwein SD, Eder S, Oh CS, Martin CE, Gable K, Bacikova D, and Dunn T (2001) Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**, 109-125.
- Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, and Huang YS (2004) Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* **43**, 36-54.
- Lomakin IB, Xiong Y, and Steitz TA (2007) The Crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell* **129**, 319-332.
- Marquardt A, Stohr H, White K, and Weber BH (2000) cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics* **66**, 175-183.
- Marszalek JR and Lodish JF (2005) Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 633-657.
- Martinez-Rivas JM, Sperling P, Luhs W, and Heinz E (2001) Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Mol Breeding* **8**, 159-168.
- McConn M, Hugly S, Browse J, and Somerville C (1994) A mutation at the *fad8* locus of Arabidopsis identifies a second chloroplast omega-3 desaturase. *Plant Physiol* **106**, 1609-1614.
- Metz JG, Flatt JH, Kuner JM. December 21, 2006. PUFA polyketide synthase systems and uses there of. *International Patent Publication WO* 2006135866
- Metz JG, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Knauf V, and Browse J (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* **293**, 290-293.
- Meyer A, Kirsch H, Domergue F, Abbadi A, Sperling P, Bauer J, Cirpus P, Zank TK, Moreau H, and Roscoe TJ (2004) Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J Lipid Res* **45**, 1899-1909.
- Michaelson LV, Napier JA, Lewis M, Griffiths G, Lazarus CM, and Stobart AK (1998) Functional identification of a fatty acid $\Delta 5$ -desaturase gene from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* **439**, 215-218.
- Moon YA, Shah NA, Mohapatra S, Warrington JA, and Horton JD (2001) Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* **276**, 45358-45366.
- Napier JA (2002) Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: a novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms. *Trends Plant Sci* **7**, 51-54.

- Nichols DS, Nichols PD, and McMeekin TA (1993) Polyunsaturated fatty acids in Antarctic bacteria. *Antarctic Sci* **2**, 149-160.
- Nugteren DH (1965) The enzymic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* **106**, 280-290.
- Oh CS, Toke DA, Mandala S, and Martin CE (1997) ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem* **272**, 17376-17384.
- Okayasu T, Nagao M, Ishibashi T, and Imai Y (1981) Purification and partial characterization of linoleoyl-CoA desaturase from rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **206**, 21-28.
- Paul S, Gable K, Beaudoin F, Cahoon E, Jaworski J, Napier JA, and Dunn TM (2006) Members of the Arabidopsis FAE1-like 3-Ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the Elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**, 9018-9029.
- Pereira SL, Huang YS, Bobik EG, Kinney AJ, Stecca KL, Packer JC, and Mukerji P (2004a) A novel omega 3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochem J* **378**, 665-671.
- Pereira SL, Leonard AE, Huang YS, Chuang LT, and Mukerji P (2004b) Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. *Biochem J* **384**, 357-366.
- Qi B, Fraser T, Mugford S, Dobson G, Sayanova O, Butler J, Napier JA, Stobart AK, and Lazarus CM (2004) Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nat Biotechnol* **22**, 739-745.
- Qiu X (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**, 181-186.
- Robert S, Singh S, Zhou X, Petrie J, Blackburn S, Mansour P, Nichols PD, Liu Q, and Green AG (2005) Metabolic engineering of Arabidopsis to produce nutritionally important DHA in seed oil. *Funct Plant Biol* **32**, 473-479.
- Schroepfer GJ and Bloch K (1965) The stereospecific conversion of stearic acid to oleic acid. *J Biol Chem* **240**, 54-63.
- Singh SP, Zhou XR, Liu Q, Stymne S, and Green AG (2005) Metabolic engineering of new fatty acids in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 197-203.
- Sperling P, Lee M, Girke T, Zahringer U, Stymne S, and Heinz E (2000) A bifunctional delta-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*: a new member of the cytochrome b5 superfamily. *Eur J Biochem* **267**, 3801-3811.
- Sprecher H (1999) An update on the pathways of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2**, 135-138.
- Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS, and Baykousheva SP (1995) Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **36**, 2471-2477.
- Stillwell W and Wassall SR (2003) Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* **126**, 1-27.
- Strittmatter P, Spatz L, Corcoran M, Rogers MJ, Setlow B, and Redline B (1974) Purification and properties of rat liver microsomal stearoyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 4565-4569.
- Takeyama H, Takeda D, Yazawa K, Yomada A, and Matsunaga T (1997) Expression of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Microbiology* **143**, 2725-2731.
- Theiede M and Strittmatter P (1985) The induction and characterization of rat liver stearoyl-CoA desaturase mRNA. *J Biol Chem* **260**, 14459-14463.
- Truksa M, Wu G, Vrinten P, and Qiu X (2006) Metabolic engineering of plants to produce very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Transgenic Res* **15**, 131-137.
- Valentine RC and Valentine DL (2004) Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog Lipid Res* **43**, 383-402.
- Wallis JG and Browse J (1999) The Delta8-desaturase of *Euglena gracilis*: an alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch Biochem Biophys* **365**, 307-316.
- Wallis JG, Watts JL, and Browse J (2002) Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci* **27**, 467-473.
- Westerberg R, Mansson JE, Golozoubova V, Shabalina IG, Backlund EC, Tvrdik P, Retterstol K, Capecchi MR, and Jacobsson A (2006) ELOVL3 is an important component for early onset of lipid recruitment in brown adipose tissue. *J Biol Chem* **281**, 4958-4968.
- Wu G, Truksa M, Datla N, Vrinten P, Bauer J, and Zank T et al. (2005) Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nat Biotechnol* **23**, 1013-1017.
- Yazawa K (1996) Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *Lipids* **31**, 297S-300S.
- Zolfaghari R, Cifelli CJ, Banta MD, and Ross AC (2001) Fatty acid delta (5)-desaturase mRNA is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in liver of adult rats. *Arch Biochem Biophys* **391**, 8-15.