

Gene Expression Profiling of Oilseed Rape Embryos Using Microarray Analysis

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

Microarray 분석을 이용한 유채 종자성숙단계별 유전자 발현 양상

노경희* · 박종석 · 김종범 · 김현욱 · 이경렬 · 김순희

Received: 3 September 2012 / Accepted: 8 October 2012 / Published Online: 31 December 2012

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2012

Abstract We observed that oil began to accumulate at 25 seed days after flowering (DAF) and reached the maximum potential at 35 seed DAF of oilseed rape, and the greatest weight of 100 seeds was obtained at 35 seed DAF. To survey a broad analysis of gene expression in developing embryos of *Brassica napus*, the Bn 300k microarray have been constructed. The Bn 300k Microarray was designed from 80,696 unigenes clustered from 543,448 ESTs and 780 cDNA at NCBI. These arrays have been hybridized in a series of experiments with probes derived from seeds and leaf of *B. napus*. Approximately 8.5% of the 7,000 genes were expressed as ratios 2-fold higher in seed (25 DAF) than leaves and 0.4% at ratios 10. Also we observed that storage and cell differentiation-related genes were highly expressed at 10 DAF, whereas energy-related genes including fatty acid metabolism were increased up depending on seed maturation using Microarray, which was confirmed by reverse transcriptase polymerase chain reaction. These results suggest that *B. napus* arrays provide a very useful data set of seed-specific expression that can be further analyzed by examination of the promoter regions of these genes and help our understanding of the complex regulatory network in developing seeds.

Keywords *Brassica napus* · embryo · fatty acid composition · gene profiling · microarray · oilseed rape

K. H. Roh · J.-S. Park · J.-B. Kim · H. U. Kim · K.-R. Lee · S. H. Kim
Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Republic of Korea

*Corresponding author (K. H. Roh: rohkh@korea.kr)

서론

유채(*Brassica napus*)는 유지작물 중 세계에서 두 번째로 넓은 재배면적을 차지하고 있으며, 기름 생산량에 있어 대두유, 팜유 그 다음으로 유채유가 세 번째로 많다고 알려져 있다. 최근 인류의 생존권을 위협하고 있는 지구 온난화를 막기 위한 방법의 일환으로 바이오 연료 생산에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다. 유채는 종자 내 기름함량이 45%로 높고, 바이오 디젤 생산에 적합한 올레인산을 60–70% 함유하고 있어 바이오 원료 작물로서 그 이용가치가 높아지고 있는 추세이다(Roh와 Park, 2007). 또한 유채는 유지작물 중 아그로박테리움을 이용한 형질 전환 기술 체계(Roh 등, 2011)가 잘 확립되어 있어 생명공학적으로 이용성이 높은 장점이 있다.

종자 발달은 수정(Fertilization) 직후부터 시작된다. 배 형성은 초기 형태발생단계(Morphogenesis phase)와 후기 성숙단계(Maturation phase)로 크게 나뉘는데, 후기 성숙단계에서 단백질, 지질 그리고 전분 등을 포함하는 저장 거대분자들이 축적되면서 건조과정에서 발생하는 스트레스에 견디고, 발아 초기에 필요한 영양분과 에너지를 공급하게 된다(Harada, 1997). 이런 과정을 거쳐 성숙된 종자는 종(種) 특성에 따라 축적되는 물질이 다르다. 일반적으로 화본과 작물은 종자에 탄수화물 함량이 많고, 두과 작물에는 단백질 함량이 많으며, 배추과 작물에는 지방산 함량이 많다고 알려져 있다. 또한 동일한 배추과 작물이라도 애기장대, 배추, 갓 그리고 유채 종자에서의 축적되는 지방산 함량이 다르며, 동일 작물이라도 품종에 따라 축적되는 지방산 함량과 지방산 조성에 차이가 있을 수 있다(Erhan 과 Adhvaryu, 2005). 그리고 이러한 차이는 유전적 특성에 의해 결정된다.

식물 세포에서 일어나는 지방산 생합성 기작은 엽록체 내

acetyl-CoA carboxylase (ACCase, EC 6.4.1.2)에 의해 시작된다. ACCase에 의해 acetyl-CoA와 bicarbonate는 Malonyl-CoA를 생성하게 되고, 이를 기질로 활용하여 Malonyl-CoA:ACP acyltransferase에 의해 탄소사슬이 2개인 Malonyl-ACP가 만들어진다. 이후 축합 반응 효소인 β -ketoacyl-ACP synthases (KASs)에 의해 탄소사슬이 2개씩 첨가되는 *de novo* 합성이 일어나며 결과적으로 탄소사슬이 18개까지 늘어나게 된다. 엽록체 내에서 합성되는 Acyl-ACP는 Acyl-ACP thioesterase에 의해 ACP가 제거되고, 남은 Acyl 기는 엽록체 막에 존재하는 Acyl-CoA synthase (ACS)에 의해 Acyl-CoA 형태로 세포질로 나오며 조면소포체(rough endoplasmic reticulum)에 존재하는 Desaturase에 의해 불포화 반응이 일어나 올레인산(C18:1), 리놀레산(C18:2), 리놀렌산(C18:3)이 만들어지고, 또 Elongase에 의해 탄소사슬이 2개씩 늘어나 탄소수가 20-24개인 지방산이 합성된다. 이렇게 합성된 지방산은 Acyltransferase에 의해 Glycerol-3-phosphate에 순차적으로 결합되며, 최종적으로 3개의 Acyl이 붙은 Triacylglycerol (TGA)이 만들어진다(Murphy, 2005).

지금까지 종자에서의 유전자 발현 양상에 대한 연구는 주로 벼(Ma 등, 2005), 애기장대(DeRisi 등, 1997) 그리고 배추(Lee 등, 2008)의 Microchip을 이용하여 이루어져 왔다. 특히, 배추과(Brassicaceae)에 속하는 애기장대에서의 게놈 분석(AGI, 2000)이 완성됨에 따라 다량의 유전자의 정보가 들어있는 Microarray를 이용하여 특정 환경하에서 또는 특정 조직에서 또는 특정 발달 시기에서 변화하는 전사인자의 조절 기작 및 관련 유전자의 다양한 발현 양상 등을 연구하는 전사체학(Transcriptome profiling) 연구가 가능하게 되었다(Fowler와 Thomashow, 2002). 그러나, 현재 진행 중인 브라시카 게놈 프로젝트의 연구 결과에 의하면 애기장대에는 약 28,000개의 유전자가 존재하는 반면, 유채의 경우 100,000개 이상의 유전자가 존재할 거라고 보고한 바 있다(<http://brassica.nbi.ac.uk/welcome.htm>). 따라서 유채 종자에서 변화하는 유전자의 다양한 발현 패턴을 좀 더 정확하게 알아 보고자 본 실험에서는 NCBI에 등록되어 있는 543,448개의 ESTs와 cDNA를 이용해서 유채 300k Microarray를 제작하였고, 종자 성숙 단계별 발현되는 수 만개의 유전자 발현 양상을 분석하였으며, 종자에서 특이적으로 발현되는 유전자를 살펴보고, 더 나아가 지방산 대사 관련 유전자 발현 패턴에 대해서 살펴보았다.

재료 및 방법

재료육성과 샘플준비. 기름함량이 높은 영산유채를 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오 에너지 작물 센터에서 분양 받아 재료로 사용하였다. 50공 육묘상자에 파종 한 후, 온도 섭씨 25°C와 16시간 명배양이 유지되는 생장상에서 6주간 육묘한 후, 섭씨 4°C와 16시간 명배양이 유지되는 저온실로 옮겨 4주간 육묘하며 춘화 처리하였다. 춘화처리가 끝난 유묘를 원예용 상토(퇴비포함)가 담긴 지름 25 cm 크기의 원형포트로 옮겨 유리온실(국립농업과학원 농업생명자원부 소재)에서 재배하였다. 개화 후 10일부터 45일까지 5일 간격으로 꼬투리를 채취하자마자 곧바로 액체질소로 얼린 후, 꼬투리에서 분리된 미성숙 종자를 모아 초저온냉동고에서 RNA를 분리할 때까지 보관하였다.

지방산 분석. 개화 후 10일부터 45일까지 5일 간격으로 꼬투리

에서 분리한 종자를 각각 100 mg씩 달아서 잘 갈은 후, 10 mL 유리관에 옮긴 후, 내부표준물질인 1000 ppm의 PDA (Pentadecanoic acid, Sigma, USA)를 1 mL 첨가한다. 그리고 여기에 0.5 N NaOH 용액 1 mL을 첨가한 후, 유리관 뚜껑을 완전히 잠근 뒤, 잘 흔들어 준 뒤, 50°C에서 15분간 반응을 시킨 뒤, 상온에 꺼내 놓고 식힌다. 메틸화 반응을 위해 14% BF₃ (Boron trifluoride, Sigma) 용액을 1 mL 첨가한 후, 잘 흔들어 준 뒤, 50°C에서 10분간 반응 시킨 후 상온에 꺼내 놓고 식힌다. Hexane 0.5 mL과 5 M NaCl 1 mL을 첨가 한 뒤 뚜껑을 잠그고 세계 흔든 뒤, 원심분리(3500 rpm, 10분간) 한 후, 상등액을 따서 Insert (250 μ L glass with polymer feet, Agilent, USA)가 들어있는 Vial (Agilent)로 옮긴 후 Blue screw cap (PTFE/silicone septa, Agilent)으로 잠근다. 지방산 추출에 사용된 용액 중, PDA, NaOH, BF₃는 메탄올에 용해되어 사용되었다. 지방산 분석에 가스크로마토그래피(HP 5890, GMI, Inc., USA)를 사용하였다. RTTM-2560 (Restek, USA) 칼럼을 사용하였으며, NLEA FAME Mix (Restek)을 표준물질로 사용하였다. 수소가스를 이동가스로 하였으며, 시료당 1 μ L씩 주입하였고, 초기 온도를 100°C로 하여 4분간 유지시킨 뒤, 분당 3°C씩 온도를 올리며, 최고 240°C까지 온도를 올린 후, 25분간 유지시켰다.

RNA 분리 및 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). 미성숙 배(100 mg)로부터 total RNA를 분리하기 위해 Urea-LiCl lysis buffer를 사용하였다(Tai 등, 2004). 잘 갈려진 시료 100 mg이 담긴 2 mL tube에 lysis buffer (8 M urea와 3 M LiCl) 1 mL을 첨가하여 잘 섞은 후, 얼음 속에 넣은 채로 4°C가 유지되는 냉장고에 넣고 16시간 정도 방치한 후, Qiashredder spin column (Qiagen Ltd, UK)를 사용하여 4°C가 유지되는 원심분리기에서 30분간 저속원심분리(5000 g) 한다. 이 때, 상등 액을 버리고 남은 침전물(pellet)에 0.5 mL resuspension buffer (0.5% SDS, 100 mM sodium chloride, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-pH 7.5, 2% polyvinylpyrrolidone)을 첨가하여 잘 섞은 후, 5분간 초고속원심분리(20,000 g) 한다. 상등 액을 새 tube로 옮긴 후, phenol (saturated with 10 mM Tris, pH 8), phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24:1) 그리고 chloroform-isoamylalcohol(24:1) 순으로 RNA를 정제해나간다. 95% 에탄올로 만든 2% potassium acetate을 상등 액의 2배 양만큼 첨가한 후, -80°C가 유지되는 초저온냉동고에 1시간 동안 방치한 후 15분간 초고속원심분리(25,000 g) 하여 RNA를 침전시킨다. 70% 에탄올로 RNA 침전물을 세척한 후, 상온에서 10분간 건조시킨 후, 멸균수 50 μ L에 녹인다. RT-PCR을 하기 위해 1 μ g total RNA를 template로 하여 MMLV reverse transcriptase (Clontech, USA)을 사용하여 42°C가 유지되는 PCR기기에서 1 시간 반응하며 1st-cDNA를 합성하였고, Advantage[®] 2 polymerase mix (Clontech)를 사용하여 유전자 특이 프라이머의 Tm값을 고려한 annealing temperature를 설정한 후 cycle을 30 번 반복하며 2nd-cDNA를 증폭하였다. 여기에서 사용한 유전자 특이 발현 프라이머 염기서열은 Table 1과 같다.

Microarray 제작 및 데이터의 표준화. 유채 종자발달단계에 따른 발현 패턴을 알아보기 위해 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>)에 등록되어 있는 780 cDNA와 543,448 ESTs를 군집 분석하여 80,696개의 unigene 정보를 얻어 한 개의 유전자당 4개의 probe를 고안하였고, 대조군으로 선 발마커에 사용되는 *bar* 등 6개의 유전자를 포함하여 이미 알려

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR

Gene	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'
Vacuolar processing enzyme	GATGGTGTGTTGCTCGGCGATACATTTAGC	TCGCGAGIATTGACCGAGCTTGAAGTAGAG
Pectinesterase family protein	TGAGTTCGCGAGTTGGGCTTAGAGAATGA	TTACCCCTCTCGCGTTTGGCTTTTATGACT
Glycosyl hydrolase family protein	ACCGCCAAGTAGTAGTGCCAAATGGTGT	GACGCATGAGCTAGTGCTTGGATTGGIAGT
Cruciferin CRU1 subunit	CATTTCGTGATAATCGCCATGTCGTCT	TGTCTCGGGAGATTTAACAACAGGAAAAG
Delta-9 desaturase-like 5 protein	ATGTGTAATCCCACTAAAGACAGTGTGCCT	TCAACGAGCTAGAGCCAGCTTCTCTTTTG
Putative epoxide hydrolase	TCCTCCACGGATTCCCTGAT	TCCGGTCGGAACAAACAGAG
Acyl carrier protein, chloroplast precursor	ATGGCGACCACCTTTCAGCGCTTCAGTGTCC	TTACTTCTT GGCTTGCATGAGCTCTTCAAT
Palmitoyl protein thioesterase family protein	ATGGCCGGTTCGGTTATGGCTCTGTCCGGG	TTGTCGTTTGAAAAGGTAGCAACTTGGTT
Putative sterol dehydrogenase	CGGTGGTTCGGTAAGGAAA	CATACGGGCCGACGTATTGA
Papatin-like protein	GTTGGATGGTGAGGAGGCAA	GTGCCGCTGATGTGCTTATG

저 있는 엽록체 내 존재하는 유전자 6개, 미토콘드리아 내에 존재하는 유전자 103개를 포함하여 전체 85,604의 유전자를 대상으로 총 341,853개의 probe를 (주)그린진바이오텍(Korea)에 의뢰하여 제작하였다. *B. napus* 300k Microarray는 NimbleGen inc. (<http://www.nimblegen.com/>)에서 제작하였다. Bn 300k Microarray의 정밀도 검정을 위해 생물학적 반복성(2반복)을 측정하였다. 유체 앞에서 분리한 total RNA를 주형으로 Cy3로 표시한 cDNA를 합성하고, 합성한 cDNA를 Bn 300k와 혼성화한 후, 전사체의 발현율을 비교 분석하여 이들의 99%가 log2 값의 범위 1내에 분포하는 것을 확인함으로써 생물학적 반복성에 따른 Bn 300k의 정밀도와 재현성을 검정하였다. 그 다음으로 유전자간 그리고 칩간의 시그널 변이를 변이값(quantile)을 사용하여 cubic spline normalization 과정을 거치며 데이터를 표준화하였다(Irizarry 등, 2003).

혼성화(Hybridization). 10 µg의 total RNA를 사용하여 Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Bn 300k 혼성화에 샘플당 13 µg의 cDNA가 사용되었다. 샘플에 19.5 µL의 2X hybridization buffer (Nimblegen, USA)를 첨가하여 혼합한 후, 최종적으로 39 µL가 되도록 deionized water를 첨가하였다. 혼성화는 MAUI chamber (Biomicro, USA)를 이용하여 42°C에서 16시간 반응하며 수행되었다. 혼성화 반응이 끝난 후, 바로 42°C로 데워진 250 mL의 Wash I buffer (Nimblegen)에 10–15초간 담가 부드럽게 흔들어주면서 1차 세척을 한 후, Wash II와 Wash III buffer를 이용하여 3단계의 세척과정을 거친 후, 1분간 500 g 속도로 저속원심분리하며 건조시킨 후, GenePix scanner 4000B (Axon, USA)를 이용하여 스캔 하였다. 시그널은 NimbleScan (Nimblegen)에 의해 분석되어 디지털화되었다.

결과 및 고찰

재료특성. 유체 종자 성숙단계별 변화하는 꼬투리 및 종자의 외형적 특성을 살펴보았다(Table 2). 개화(Fig. 1A)후 수분이 된 배(embryo)는 꼬투리를 형성(Fig. 1B)하기 시작하여 개화 후 약 15일이 될 때까지 꼬투리의 길이가 평균 60 mm로 급격히 성장하는 어린 꼬투리 시기에 해당하였고, 개화 후 약 25–30일 정도에는 꼬투리가 완전히 신장하며 종실이 비대해지고 꼬투리 색이 여전히 녹색을 띠고 있는 녹협기에 해당하였으며, 이때 꼬투리 무게가 최대로 증가하면서 꼬투리와 줄기의 각도가 거의

Table 2 Characterization of developing seeds in *B. napus* cv. ‘Youngsan’

Days after flowering	Length of pod (mm)	Weight of pod (mg)	Weight of 100 seeds (mg)
10	39±5.4 ^a	65±14	74±17
15	60±4.2	242±27	213±9
20	59±3.0	329±13	250±16
25	73±4.2	639±19	398±14
35	69±3.2	531±46	483±18
45	68±4.1	473±36	406±13

^a Standard deviation

90도를 이루었고, 또한 이 시기에 꼬투리 색이 녹색에서 보라색으로 점차 변화하는 것을 관찰하였다(Fig. 1C). 개화 후 35일 정도 되면 종실이 완전히 충실해져 백립중이 평균 483 mg으로 가장 무거워지고, 꼬투리 길이가 줄어들고 꼬투리 무게가 감소하면서 꼬투리 색이 점 점 황색으로 변하는 꼬투리 황변기가 시작되었으며, 개화 후 45–50일이 되면 꼬투리가 단단해지며, 종실이 건조해지고 꼬투리 색이 담갈색으로 변하면서 꼬투리 무게와 백립중이 각각 평균 473과 406 mg으로 감소함에 따라 꼬투리가 곧추 세워지면서 줄기와 꼬투리의 각도가 15–30도를 이루며 성숙기에 도달하는 것을 관찰하였다.

종자 성숙 단계별 지방산 조성 함량 변화. 종자 성숙도에 따른 지방산 조성의 변화를 살펴보면 배형성이 시작되면서 어린 꼬투리시기를 거쳐 녹협기 직전까지는 배 발달과 종자 성숙에 필요한 단백질 및 전분합성이 주로 일어나는 시기로 지방산 합성은 거의 이루어지지 않는 것으로 관찰되었다(Table 3). 지방산은 녹협기와 꼬투리 황변기가 일어나는 개화 후 25일에서 35일 사이에 대부분 생성 되는 것을 알 수 있었으며, 꼬투리 황변기 이후부터 종자 성숙기에 도달할 때까지 지방산 전체 함량 및 지방산 조성 비율은 거의 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 이러한 실험결과는 Zeman과 Kratochvil (1967)이 보고한 유체의 지방산 합성이 종자발달후기(the second half of seed maturation)에 주로 일어나며, 지방산 함량은 종자성숙도와 비례하여 증가하다가 종자가 완전히 성숙되면 약간 감소하였다는 결과와 일치하였다.

Total RNA 분리. 종자는 잎과 달리 탄수화물, 지질 등이 많아 total RNA 분리가 어렵다. 가장 일반적으로 사용하는 Trizol reagent (Invitrogen, USA)를 이용했을 경우, total RNA 양이 매우 적고, 전반적으로 RNA 저하(degradation)가 심하게 발생

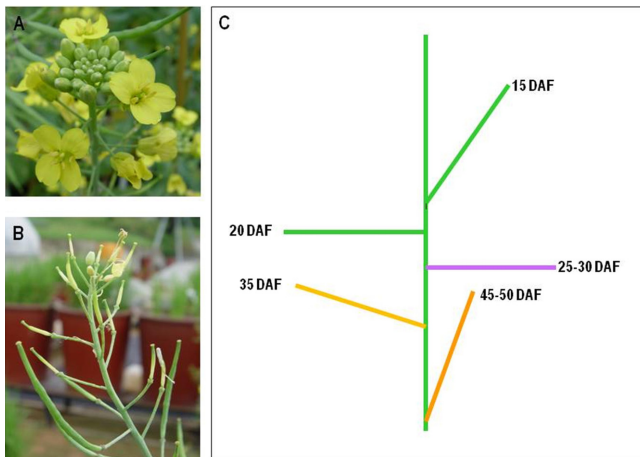


Fig. 1 Simplified scheme of the seedpod maturation process in *B. napus*. (A) Flowering of *B. napus*. (B) Seedpod formation and maturation after pollination. (C) Changes in the angle and color of the seedpod depending on the seed maturation. DAF: Days after flowering.

하였다(data not shown). 종자에서 total RNA를 잘 분리하기 위해서 지금까지 발표된 여러 방법 중 Tai 등(2004)의 방법과 Birtić과 Kranmer (2006)의 방법을 이용하여 유채 종자에서 total RNA를 분리한 결과, Tai 등(2004)의 방법에 의해 거의 완전하고 많은 양의 total RNA를 분리할 수 있었다(Fig. 2). Birtić과 Kranmer (2006)의 방법으로는 많은 양의 total RNA는 분리할 수 있었으나, RNA 저하(degradation)가 심하게 일어남을 볼 수 있었다(data not shown). 이러한 결과는 아마도 고온처리가 많은 실험방법에 그 원인이 있는 것으로 사료된다.

Microarray 데이터의 신뢰성과 발현 양상. 종자특이 유전자 발현패턴을 알아보기 위해서 개화 후 10일, 25일 그리고 35일된 미성숙 종자와 어린 잎에서 total RNA를 분리하였으며, 이 때 잎은 종자특이 발현 유전자를 탐색하는 대조구(reference)로 이용되었다. NCBI에 등록되어 있는 유채 유전자정보 데이터베이스를 이용하여 군집분석을 통해 획득한 85,604개의 독립유전자의 염기서열을 토대로 Bn 300k Microarray를 제작하였고, 여기에 샘플에서 추출한 각각의 total RNA로부터 만들어진 cDNA를 혼성화하였다. 잎 간(間) 그리고 잎과 종자 간(間)의 발현 프로파일은 형광신호의 값을 \log_{10} 의 값으로 변환하여 ratio와 신호의 세기에 대한 함수로 표현되는 scatter plot으로 살펴보았다(data not shown). Microarray 실험은 상이한 생물학 표본간에 수 십만 개의 유전자 발현패턴 변화를 측정하는 것으로, Microarray 실험의 정교함과 데이터의 신뢰성이 우선적으로 확보되어야 한다. 지금까지 이러한 것을 검정하기 위해 scatter

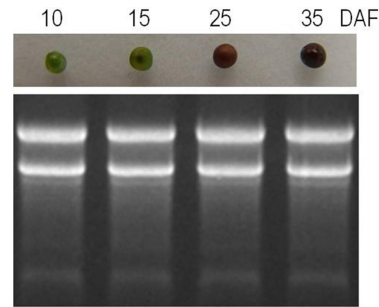


Fig. 2 Total RNA isolation from developing seeds in *B. napus*. (Upper panel) Seeds used for this experiment depending on maturation. (Lower panel) Visualization of total RNA on 1% agarose gel extracted from developing seeds according to Tai et al. (2004).

plot 데이터가 제시되었고, 그 중요성은 여러 논문에서 제기된 바 있다(Tusher 등, 2001; Irizarry 등, 2003). 본 실험에서 대조구로 사용된 잎 간(間) 발현 프로파일을 살펴본 결과, ratio가 거의 1.0인 대각선을 볼 수 있었는데, 이를 통해 우리는 Microarray 데이터를 신뢰할 수 있다고 판단하였다. 종자와 잎의 유전자 발현 프로파일을 비교해 보면 종자가 성숙함에 따라 ratio가 1.0인 대각선을 기준으로 그 분포 범위가 넓어지는 것을 볼 수 있었다.

이 외에도, 잎을 기준으로 종자에서의 발현 양이 2배, 4배 그리고 10배 이상 증가하는 유전자 분포 비율을 조사하였다(Table 4). 잎에 비해 2배 이상 증가하는 유전자는 25 days after flowering (DAF)에서 8.5%로 가장 많았고, 10 DAF와 35 DAF에서 각각 4.6와 4.9%를 나타냈다. 4배 이상 증가하는 유전자의 분포 비율은 35 DAF > 25 DAF > 10 DAF 순으로 나타났다으며, 10배 이상 증가 분포 비율은 모든 처리에서 평균 0.3–0.4%에 해당되었다. 이러한 결과는 Girke 등(2000)이 보고한 애기장대의 Microarray 실험에서 잎과 미숙종자간의 종자특이 발현 유전자 분포 비율과 일치하는 경향이였다.

종자 성숙 단계별 특이 발현 유전자 탐색. 종자가 성숙함에 따라 변화하는 유전자의 발현 양상을 Bn 300k Microarray 데이터를 통해 살펴보았다(Fig. 3). 기능별로 크게 저장관련, 세포발달관련 그리고 대사관련 부분으로 나누어 살펴 보았는데, 저장 및 세포발달 관련 유전자 군들은 종자가 성숙함에 따라 점차 감소하는 경향을 보인 반면, 대사관련 유전자 군들은 종자가 성숙하면서 다소 증가되는 경향이였다(Fig. 3A). 종자 성숙에 따른 대사관련 유전자 군의 발현양상을 좀 더 세밀하게 살펴보면, 종자발달 초기에 주로 관여하는 세포분열 및 저장단백질 관련 유전자 군의 발현양상은 개화 후 10일 종자에서 발현 양이 증가하다가 종자가 성숙되어 감에 따라 점차 감소되는 경향을

Table 3 Changes in fatty acid composition (% of total) depending on seed maturation in *B. napus*

Days after flowering	Palmitic acid (C16:0)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)	Eicosenoic acid (C20:1)	Erucic acid (C22:1)	Total (mg/g)
10	16.6	7.4	3.0	52.6	20.4	-	-	5.3
15	14.1	8.4	-	56.4	21.1	-	-	3.7
20	5.5	6.7	6.8	57.4	21.0	-	-	3.9
25	8.3	40.6	38.0	-	12.0	1.2	-	15.2
35	2.9	2.7	67.0	18.7	6.4	0.9	1.1	204.4
45	3.1	3.2	64.9	21.1	5.4	1.1	1.1	197.7

Table 4 Number of genes with developing seed-specific expression patterns in *B. napus*

Expression ratio ^a	10 DAF	25 DAF	35 DAF
2	3,968(4.6%) ^b	7,256(8.5%)	4,226(4.9%)
4	984(1.1%)	1,277(1.5%)	1,629(1.9%)
10	332(0.4%)	350(0.4%)	259(0.3%)

^a Ratio categories. Genes in these categories showed in at least two duplicate experiments ratios above the given thresholds. ^b Percentage based on 85,604 unigenes. Leaf was used reference in this experiment.

보인 반면, 종자 발아 및 유묘 초기 생육에 필요한 에너지 축적 및 전환 관련 유전자군 그리고 종피색 등에 관여하는 이차 대사산물과 무기이온 이동 관련 유전자 군은 종자가 성숙함에

따라 발현 양이 점차 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3B). 이 결과는 그 동안 보고된 종자 성숙 단계별 축적되는 물질과 이와 관련된 유전자 발현 양상과 거의 일치하는 경향을 보였다 (Bradford와 Nonogaki, 2007; Le 등, 2010; Venglat 등, 2011).

종자 성숙 단계별 종자에서 특이적으로 많이 발현되는 유전자를 탐색하였다(Table 5). 표5에서 보여지듯 종자 성숙도에 따라 유전자의 발현 양에 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. 개화 후 10 DAF 종자에서 가장 많이 발현되는 것으로 보여지는 vacuolar processing enzyme (VPE)과 thionin precursor은 저장 단백질 생성에 관여하는 유전자로 미숙종자에서 많이 발현된다는 연구결과가 보고된 바 있다(Ponz 등, 1983; Hara-Nishimura 등, 1993; Cadman 등, 2006; Gómez 등, 2006). 이 외에도 지질 대사 관련 유전자인 Glycerolphoryl diester phosphodiesterase (TC209132) 및 세포벽 변형에 관여하는 Pectinesterase family

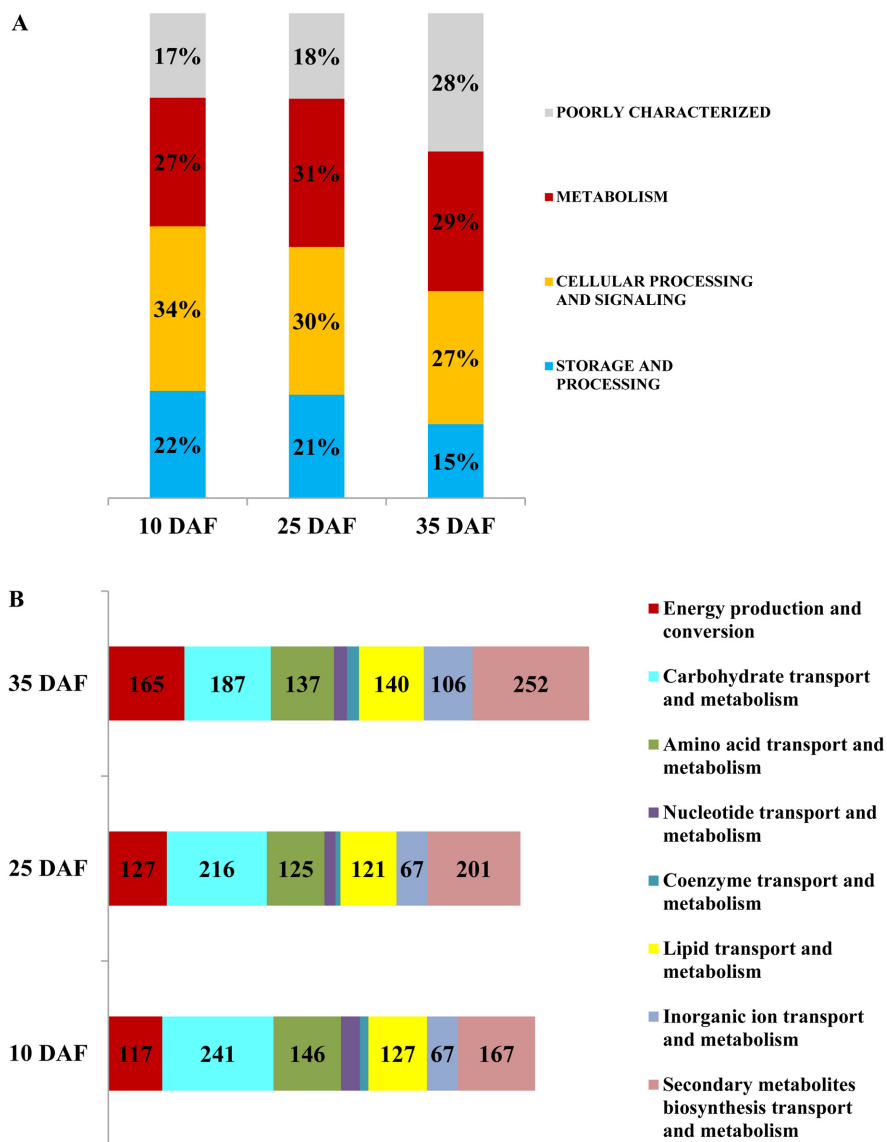


Fig. 3 Functional analysis of developing seeds in *B. napus*. (A) Proportion of predicted *B. napus* genes in different functional categories. (B) Comparison of metabolism categories among developing seeds. The percentage (A) or number (B) of genes with expression changes of 2-fold higher is shown.

Table 5 Examples of highly expressed and seed-specific genes of *B. napus*

Putative Function ^a	BnGI code	GeneBank Accession	10 DAF ^b	25 DAF	35 DAF
Delta vacuolar processing enzyme	TC212283	NP_188656	8.18 ^c	7.95	4.1
Thionin precursor	TC193550	Q9SBK8	8.10	5.31	0.31
Glycerolphosphoryl diester phosphodiesterase	TC209132	NP_188688	7.21	6.94	3.05
Pectinesterase family protein	TC184421	NP_192139	7.08	3.38	0.23
Glycosyl hydrolase family protein	TC179176	NP_181494	6.51	1.08	0.4
Protease inhibitor	TC191959	NP_973462	6.49	5.18	2.35
Seed specific protein	TC179303	AAP37968	6.33	2.59	0.08
Lipid transfer like protein	TC189195	AAS68185	6.2	7.47	6.5
Seedstick	TC168803	NP_001078364	6.15	5.66	4.56
SHP2 (Shatterproof2) transcription factor	TC169329	NP_565986	6.11	4.57	1.86
Subtilase family protein	TC165637	NP_567633	6.09	5.93	3.26
Ribonuclease1	TC182806	AAM63798	6.03	3.9	2.27
The recombinant pronapin precursor	TC180271	ISM7	2.89	7.7	8.55
Carboxylic ester hydrolase	TC194145	NP_177268	2.01	6.63	0.15
Senescence-specific cystein protease	TC196353	AAD53012	5.94	6.23	3.51
Plastocyanin-like domain-containing protein	TC166479	NP_567806	4.47	6.22	3.38
Putative reversibly glycosylated polypeptide-3 RGP	TC190245	BAC43271	1.64	6.2	0.69
Cruciferin CRU1 subunit	TC190219	AAK07609	1.74	4.31	7.85
Cruciferin CRU3 subunit	TC177196	P33525	1.89	6.02	7.05
Oleosin (OLEO4)	TC194124	NP_189403	2.01	5.86	6.97
Cruciferin CRU4 subunit	TC168253	P33522	2.08	5.68	6.95
Napin embryo-specific precursor	TC181087	P11090	2.01	5.72	6.88
Oleosin 2 (OLEOSIN 2)	TC187173	NP_198858	1.32	4.71	6.47
Caleosin	TC194352	AAY40837	0.85	3.07	6.43

^a Putative function based on BLAST analysis. ^b Days after flowering. ^c The logarithm base 2 value of the expression ratio between seed and leaf.

Table 6 Examples of highly expressed genes within lipid metabolism category of *B. napus*

Putative Function ^a	BnGI code	GeneBank Accession	10 DAF ^b	25 DAF	35 DAF
Delta-9 desaturase-like 5 protein	TC197470	ADSL5_ARATH	28.05 ^c	14.23	40.54
Putative epoxide hydrolase	TC172341	Q9M9W5_ARATH	21.16	7.36	-1.07
Acyl carrier protein, chloroplast precursor	TC175678	ACP5_BRANA	2.08	13.12	10.62
Delta-9 acyl lipid desaturase 1	TC185472	ADS1_ARATH	1.49	10.92	4.59
Patatin-like protein	TC162000	Q8L3P2_ARATH	6.83	10.92	8.6
Putative acyl-CoA synthetase	TC162196	O22898_ARATH	1.21	-1.98	10.17
Delta-8 sphingolipid desaturase	TC162290	Q9ZRP8_BRANA	4.12	8.09	8.25
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	TC209749	Q3KFH0_PSEPF	-1.48	1.09	8.02
Acetyl-CoA carboxylase	TC207233	Q9FEH8_BRANA	1.01	-2.22	8.82
Putative phosphatidylinositol/ Phosphatidylcholine transfer protein	TC174537	Q9SJS7_ARATH	-1.01	-2.21	8.3
3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	TC186518	Q8YB80_BRUME	-1.72	1.13	7.48
Papatin-like protein	TC162000	O23181_ARATH	6.76	3.81	3.33
Putative sterol dehydrogenase	TC175899	O22856_ARATH	6.96	4.11	-1.64
Putative Delta(7)-sterol-C5(6)-desaturase 2	TC173815	SC5D2_ARATH	1.04	6.22	1.54
Palmitoyl protein thioesterase family protein	TC167422	Q2A9A2_BRAOL	6.17	2.49	1.07
Probable ABC2 homolog 6	TC190805	ATH6_ARATH	1.14	6.08	4.02
Putative phospholipase	TC167288	O80627_ARATH	4.99	1.44	-4.03

^a Putative function based on BLAST analysis. ^b Days after flowering. ^c Intensity ratios of seed 10 DAF, seed 25 DAF and seed 35 DAF versus leaf experiments, respectively.

protein (TC184421)와 Hydrolase family protein (TC179176)의 발현양상을 살펴보면 개화 후 10일된 미숙종자에서 발현 양이 가장 높았고, 점차 감소되다가 개화 후 35일 된 미숙종자에서는 발현 양이 감소되는 것을 알 수 있었다. 이 밖에도 유채 종자에 특히 많은 저장 단백질인 cruciferin 합성 관련 유전자군

(TC180271, TC190219, TC168253, TC181087)은 종자가 성숙함에 따라 그 발현 양이 점 점 증대하는 것으로 보여진다.

종자 성숙 단계별 지질 대사 관련 유전자의 발현양상을 살펴 보았다(Table 6). Table 3에서 개화 후 25일 종자에서는 지방산 함량이 15.2 mg/g으로 매우 적고, 개화 후 35일 종자에서는

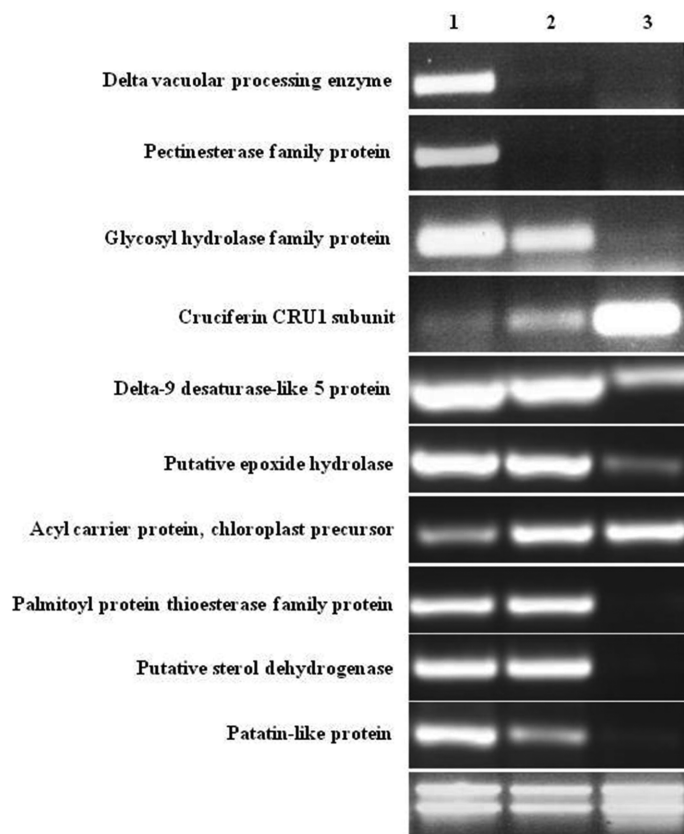


Fig. 4 RT-PCR analysis of selected differentially expressed genes of *B. napus*. Putative function was listed on the left side. (Lower panel) Visualization of total RNA on 1% agarose gel extracted from developing seeds and various tissues. Lane 1, 10 DAF; Lane 2, seed 25 DAF; Lane 3, seed 35 DAF.

204.4 mg/g으로 급격히 지방산이 생성되는 것을 관찰하였다. 그러나, 유전자 수준에서 지질 대사 관련 유전자들의 발현 양상을 보면 개화 후 10일된 종자에서부터 유전자가 발현되는 것으로 보여진다. 이러한 유전자(mRNA) 발현 시기와 유전자 산물 축적간의 시간적 차이는 이미 여러 논문에서 보고된 바 있다 (Dyer 등, 1989; Glanemann 등, 2003). 포화지방산인 스테아르산(C18:0)에 이중결합을 만들어 불포화지방산인 올레인산(C18:1)을 만드는데 관여하는 delta-9 desaturase-like 5 protein은 종자가 성숙되는 전 과정에서 높게 발현되는 것을 알 수 있었다. 이와 비슷한 발현양상을 보이는 putative epoxide hydrolase는 불포화지방산에 있는 epoxide 기질을 diol로 가수분해시키는 효소로 잘 알려져 있다(Lee 등, 2006). Acyl carrier protein은 엽록체 내에서 탄소길이가 증가되는 포화지방산 각 각에 acyl기를 붙여주는 단백질로 지방산 합성이 지속되는 전 시기에 걸쳐 유전자가 꾸준히 발현되는 것으로 보여진다. Microarray 데이터를 통해 알아본 종자 성숙 단계별 유전자의 발현양상을 RT-PCR로 확인 한 결과, 거의 대부분 일치함을 알 수 있었다(Fig. 4).

본 실험을 통해 우리는 Bn 300k Microarray를 이용해서 유채 종자 성숙 단계별 변화하는 유전자의 발현 양상을 관찰할 수 있었으며, 특히 지질 대사 관련 유전자의 발현 양상을 살펴 보았다. 이러한 결과는 추 후 종자 특이 발현 프로모터를 개발하거나 또는 유전자 발현 양상에 따른 대사기작 연구에 유용하게 이용 될 수 있을 거라 사료된다.

초 록

유채 종자 성숙단계별 변화하는 종자의 특성을 살펴본 결과, 개화 후 25일된 미성숙 종자에서 지방산 생성이 관찰되기 시작하였으며, 개화 후 35일된 미성숙 종자에서 지방산 생성이 거의 최고치에 달하는 것을 관찰하였으며, 이 때 백립중이 406 mg으로 가장 무거웠다. 유채 300k Microarray를 이용하여 유채 종자 성숙단계별 발현되는 유전자의 발현양상을 살펴보았다. 유채 300k Microarray는 NCBI에 등록되어 있는 543,448개의 ESTs와 780개의 cDNA정보를 군집 분석하여 80,696개의 유전자정보를 얻어 제작되었다. 개화 후 10, 25, 그리고 35일된 종자에서 total RNA를 분리하여 유채 300k Microarray 실험을 수행한 결과, 약 7,000개의 유전자에 해당하는 8.5%가 외에 비해 종자(25DAF)에서 발현 양이 2배 이상 증가됨을 알 수 있었고, 10배 이상 증가하는 유전자 비율도 0.4%에 해당하였다. 종자 특이 발현 유전자의 발현양상을 보면, 초기에는 저장 및 세포분화 관련 유전자들의 발현 양이 높게 나타난 반면, 후기에는 지방산 대사 관련 유전자를 포함한 에너지 축적 관련 유전자들의 발현 양이 높게 나타나는 것을 관찰 할 수 있었으며, reverse transcriptase-polymerase chain reaction을 통해서 이를 확인하였다. 본 실험 결과는 종자 특이 발현 프로모터를 발굴하거나 특정 대사 기작 연구에 관여하는 유전자 발현 양상을 광범위하게 살펴봄으로써 좀 더 심도 있는 연구를 할 수 있는 기초자료를 제공하는데 많

은 도움이 될 거라 사료된다.

Keywords *Brassica napus* · embryo · fatty acid composition · gene profiling · microarray · oilseed rape

감사의 글 본 논문은 2012년도 농촌진흥청 국립농업과학원의 기관고유사업(PJ006745) 지원에 의해 이루어졌으며 이에 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

- Arabidopsis Genome Initiative (2010) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- Birtić S and Kranner I (2006) Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seeds. *Phytochem Analysis* **17**, 144–8.
- Bradford K and Nonogaki H (2007) Seed development, dormancy and germination. In Annual Plant Reviews. Blackwell publishing Ltd, Oxford, UK.
- Cadman CSC, Toorop PE, Hilhorst HWM, and Finch-Savage WE (2006) Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicates a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J* **46**, 805–22.
- DeRisi JL, Iyer VR, and Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genome scale. *Science* **278**, 680–6.
- Dyer WE, Henstrand JM, Handa AK, and Herrmann KM (1989) Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in *Solanaceae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 7370–3.
- Erhan SZ and Adhvaryu A (2005) Non-food lipids. In *Plant Lipids*, pp. 103–22. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Fowler S and Thomashow MF (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* **14**, 1675–90.
- Girke T, Todd J, Ruuska S, White J, Benning C, and Ohlrogge J (2000) Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds. *Plant Physiol* **124**, 1570–81.
- Glanemann C, Loos A, Gorret N, Willis LB, O'Brien XM, Lessard PA et al. (2003) Disparity between changes in mRNA abundance and enzyme activity in *Corynebacterium glutamicum*: implications for DNA microarray analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 61–8.
- Gómez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, and Graham IA (2006) Delayed embryo development in the *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant J* **46**, 69–84.
- Harada JJ (1997) Seed maturation and control of germination. In *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, pp. 545–92. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Hara-Nishimura I, Takeuchi Y, Inoue K, and Nishimura M (1993) Vesicle transport and processing of the precursor to 2S albumin in pumpkin. *Plant J* **4**, 793–800.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, and Speed TP (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* **31**, e15.
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaster JA, Kwong L, Drews GN et al. (2010) Global analysis of gene activity during *Ariabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 8063–70.
- Lee SC, Lim MH, Kim JA, Lee SI, Kim JS, Jin M et al. (2008) Transcriptome analysis in Brassica rapa under the abiotic stresses using Brassica 24K Oligo Microarray. *Mol Cells* **26**, 595–605.
- Lee SJ, Kim HS, and Lee EY (2006) Enhanced heterologous expression of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase and its application to enantioselective hydrolysis of racemic epoxides. *J Korean Ind Eng Chem* **17**, 557–60.
- Ma L, Chen C, Liu X, Jiao Y, Su N, Li Let al. (2005) A microarray analysis of the rice transcriptome and its comparison to Arabidopsis. *Genome Res* **15**, 1274–83.
- Murphy DJ (2005) Fatty acid biosynthesis. In *Plant Lipids*, pp. 27–56. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Ponz F, Paz-Ares J, Hernández-Lucas C, Carbonero P, and García-Olmedo F (1983) Synthesis and processing of thionin precursors in developing endosperm from barley (*Hordeum vulgare* L.). *EMBO J* **2**, 1035–40.
- Roh KH and Park JS (2007) Biodiesel:oil-crops and biotechnology. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **50**, 137–46.
- Roh KH, Kwak BK, Kim HU, Lee KR, Kim SH, Suh MC et al. (2011) Production of transgenic plants in *Brassica napus* Winter cultivar 'Youngsan'. *J Appl Biol Chem* **54**, 26–32.
- Tai HH, Pelletier C, and Beardmore T (2004) Total RNA isolation from *Picea mariana* dry seed. *Plant Mol Biol Rep* **22**, 93a–93e.
- Tusher VG, Tibshirani R, and Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5116–21.
- Venglat P, Xiang D, Qiu S, Stone SL, Tibiche C, Cram D et al. (2011) Gene expression analysis of flax seed development. *BMC Plant Biol* **11**, 1–14.
- Zeman I and Kratochvíl V (1967) Changes in the composition of winter rape oil during seed maturation. *Biologia Plantarum* **9**, 1–14.