

식물에서 Carotenoid 생합성 경로와 대사공학적 응용

하선화*, 김정봉, 박종석, 류태훈¹, 김경환, 한범수, 김종범, 김용환
농업생명공학연구원 신기능소재개발과, ¹유전자제어공학과

Carotenoids Biosynthesis and Their Metabolic Engineering in Plants

Sun-Hwa Ha*, Jung-Bong Kim, Jong-Sug Park, Tae-Hun Ryu¹, Kyung-Hwan Kim, Bum-Soo Hahn,
Jong-bum Kim, Youg-Hwan Kim

Metabolic Engineering Division, ¹Plant Biotechnology Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA,
Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT Carotenoids are synthesized from the plastidic glyceraldehyde-3-phosphate (GAP)/pyruvate pathway in isoprenoids biosynthetic system of plants. They play a crucial role in light harvesting, work as photoprotective agents in photosynthesis of nature, and are also responsible for the red, orange and yellow colors of fruits and flowers in plants. In addition to biological actions of carotenoids as antioxidants and natural pigments, they are essential components of human diet as a source of vitamin A. It has been also suggested that some kinds of carotenoids might provide protection against cancer and heart disease as human medicines. In this article, we review the commercial applications on the basis of biological functions of carotenoids, summarize the studies of genes involved in the carotenoid biosynthetic pathway, and introduce recent results achieved in metabolic engineering of carotenoids. This effort for understanding the carotenoids metabolism will make us to increase the total carotenoid contents of crop plants, direct the carotenoid biosynthetic machinery towards other useful carotenoids, and produce a new array of carotenoids by further metabolizing the new precursors that are created when one or two key enzymes in carotenoid biosynthetic pathway are exchanged through gene manipulation in the near future.

Key words: Carotenoids, isoprenoids, metabolic engineering

서 론

카로티노이드(carotenoid)는 자연계에서 널리 분포하는 대표적인 천연색소로서 식물은 물론이고, *Synechococcus*, *Rhodobacter* 등의 광합성 세균, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Spirulina* 등의 미세 조류, *Erwinia* 등의 비 광합성 세균 및 *Neurospora*, *Phycomyces* 등의 곰팡이에서도 합성된다. 카로티노이드는 카로틴(carotene)과 크산토펴(xanthophyll)의 총칭으로써 카로틴은 1831년 Wackenroder에 의해 당근(*Daucus*

carota)에서 최초로 분리되었고 크산토펴은 1837년 Berzelius에 의해 단풍의 노란 색소 성분으로 분리되었다.

특히 식물에서 세포 내 색소체(plastid)에서 합성되어 저장되는 카로티노이드는 잎 등 클로로필(chlorophyll)이 있는 조직의 엽록체(chloroplast)에서는 광합성의 보조색소(accessory pigment)로서 광흡수(light harvesting)에 관여할 뿐 아니라 과도한 빛 에너지로부터 세포를 보호하는 광보호(photo-protection) 기능을 수행하고, 과일, 종자, 꽃 등 클로로필이 없는 조직에서는 잡색체(chromoplast)에 축적되어 적색, 홍색, 황색 계열의 색깔을 부여함으로써 자신의 종자번식을 위한 동물 유인의 한 도구로서 사용되며, 식물 호르몬 abscisic acid (ABA) 합성을 위한 전구물질이기도 하다. 카로티노이드를 생

*Corresponding author Tel 031-299-1735 Fax 031-299-1732
E-mail shha@rda.go.kr

합성할 수 없는 동물에서는 음식을 통해 섭취된 카로티노이드 물질이 비타민 A 전구체로서 이용되며, 항산화 물질 및 암 발생 예방 물질로서 영양성과 기능성이 우수한 화합물로 입증되어 왔다 (Pfander 1992).

현재까지 자연계에는 미생물과 식물에서 약 150개의 유전자에 의해 코드 되는 카로티노이드 생합성 관련 효소 20여 종에 의해서 600여 종의 카로티노이드가 만들어지는 것으로 알려져 있다. 그 중 상업적으로 중요한 위치를 차지하는 대표적인 카로티노이드는 미세 조류에서 생합성되는 β -carotene과 astaxanthin이며, 식물의 경우 여러 종간에 엽록체의 카로티노이드 성분은 비교적 차이가 없으나 잡색체에 축적되는 카로티노이드의 주성분은 lycopene (토마토), β -carotene (당근), β -cryptoxanthin (귤), zeaxanthin (옥수수), capsanthin (고추) 등 식물체에 따라 다양하다. 1990년대 초반부터 본격화된 카로티노이드 생합성 유전자들에 대한 연구는 현재까지 거의 모든 종류의 카로티노이드 생합성 관련 유전자들이 분리되기에 이르렀고 이를 기반으로 최근에 golden rice 등 카로티노이드 대사공학을 위한 성공적인 첫 걸음이 시작되었다.

본 고찰은 카로티노이드가 식물 대사공학을 위한 대상물질로써 지니는 의의와 카로티노이드 생합성 관련 유전자 연구의 동향 및 여러 대사공학적 시도들을 조사해 봄으로써 카로티노이드 대사공학을 위한 최선의 디자인을 유추해 보고자 하였다. 더 나아가, 식물체내에서 일차대사산물일 뿐 아니라 alkaloid, phenolic compound, flavonoid 등과 더불어 대표적인 이차대사 산물의 하나인 isoprenoid계 물질인 카로티노이드의 대사경로가 식물 유용 이차대사공학을 위해 가지는 의미를 재조명해 보고자 한다.

카로티노이드의 생리적 기능 및 상업적 이용

자연계에서 연 간 생산량이 약 1억톤 이상으로 추정되는 카로티노이드의 역할은 일차적으로 광합성 과정에서 blue-green 파장의 빛을 흡수하여 광합성 반응 중심 (reaction center)으로 전이하는 보조색소이며, lutein, β -carotene, violaxanthin, neoxanthin 순으로 엽록체의 구조 형성과 안정성 유지에도 기여하고 있다. β -carotene은 클로로필 a와 함께 광합성 반응중심에 존재하고, lutein, violaxanthin, neoxanthin 등의 크산토펜 물질들은 광흡수 복합체 II, 클로로필 a, b와 함께 주변 안테나에 존재한다. 그리고, 잡색체에서 카로티노이드는 적색, 홍색, 황색 계열의 색소로 축적되어 아름다운 꽃과 과일의 색깔로 종자 번식을 위한 곤충과 동물의 유인제 역할을 수행한다. 이를 상업적으로 이용한 것이 식품, 약품, 화장품 등의 천연착색제와 양계나 양식업에서 난황과 어류의 천연색소 개선택제 등이다.

또한, 산소 라디칼을 소거하는 광보호제로서의 역할이 기능성 항산화제, 암예방제 및 프리라디칼 소거제 등의 상업적 소

재로 이용될 뿐 아니라, 동물체내에 섭취된 후 조직의 성장, 분화 조절 물질 (retinoic acid), 주요 시각 색소 (retinal과 rhodopsin), 비타민A (retinol) 등을 포함하는 retinoid 물질로 전환됨으로써 영양강화제, 식품보조제 등 동물체내에서의 여러 가지 생리활성 기능이 부각되고 있다.

천연색소

갑각류, 어류, 조류 그리고 난황 등 동물에서 보이는 대부분의 적색, 홍색, 황색은 이들이 카로티노이드를 생성하는 미세 조류나 식물을 섭취한 후 몸 속에 축적함으로써 보여지는 색깔이다. 천연착색제로서 카로티노이드는 주로 카로티노이드 함유 식물의 엑기스분이나 야채오일 현탁액 및 두나리엘라, 클로렐라, 스피루리나 등의 광합성 미세조류의 건조 분말 형태로 공급되어 마아가린, 과일 드링크, 샐러드 드레싱, 케이크, 아이스크림 등의 식품 가공과 약품, 화장품 등에 색소첨가제로 사용되고 있다.

Lutein과 zeaxanthin의 경우 계란 및 어육의 색소개선택제로 주로 사용되고, 가지과 식물인 고추 (*Capsicum annuum*)의 과실에서 추출하여 얻어지는 적색 천연색소인 capsanthin의 경우 비교적 열, 빛에 안정하며 지용성, 수용성, 분말 타입의 파프리카 색소로 시판되고 있다. 최근에 가장 주목받고 있는 색소 중의 하나인 astaxanthin은 시장에서 kg당 3,000 달러를 호가하고 있는 상당히 부가가치가 높은 담수조류 생산물질이다. β -carotene의 10배, α -tocopherol의 100배에 달하는 항산화 효과를 지니고 있을 뿐 아니라 연어나 송어 등 양식 및 난황의 착색제로서 양계 사료 첨가제로 이용되고 있다. 최근에 우리나라의 한 화장품 회사에 의해 항산화 기능 및 천연색소 첨가제로서 고급 기능성 화장품에 첨가되고 있다.

항산화제

생체 내에서 카로티노이드는 불안정한 산소 분자인 프리라디칼에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는 기능을 담당하는 항산화 물질이다. 프리라디칼 소거제로서 이런 생물학적인 기능은 카로티노이드의 화학구조가 3~15개의 conjugated double bond를 포함하는 polyene chain을 가진 C₄₀ isoprenoid 물질임에 기인한 것으로 이런 구조적인 특징이 사람에게 의해 섭취된 후에 암 뿐만 아니라 여러 가지 질병에 대한 위험을 감소시키는 예방 물질로서의 기능을 부여하게 된다 (Hirschberg 2001). 비슷한 화학적인 구조에도 불구하고 각각의 카로티노이드는 사람 신체의 조직별로 다른 작용이 보고되어 임상적으로도 상이하게 사용되고 있는데, cryptoxanthin, α -carotene, lycopene은 몇몇 종류의 암에 대한 예방 기능이 있고, lycopene과 β -carotene은 암 치료시 면역기능을 향상시키고, α -carotene, lycopene, β -carotene은 심장질환을 예방하며, β -carotene, lycopene, cryptoxanthin은 당뇨병의 진행을 저지하

고, lutein과 zeaxanthin은 백내장이나 퇴행성 황반변성 (age-related macular degeneration, AMD) 등의 안 질환을 예방한다. 특히 복합 카로티노이드 처방 시 알츠하이머병과 노화 방지에 효과가 있으며, 남성 불임 치료에 효과가 있음이 알려져 있다.

프로비타민 A

시력과 성장 및 조직 분화에 중요한 역할을 하는 비타민 A는 자연계에서 두 가지 형태로 발견되는데 동물에서는 레티놀의 형태로, 식물과 광합성 미생물에서는 카로티노이드라는 프로비타민 A의 형태로 존재한다. 사람을 비롯한 동물의 경우 음식을 통해 카로티노이드 성분을 섭취한 후 그 중 10% 정도가 간이나 신장 조직에서 dioxygenase에 의해 절단되어 retinal을 거쳐 retinol, retinoic acid, rhodopsin 형태로 전환되어 이용된다. 자연계에 존재하는 600여 종의 카로티노이드 중 50여 종 정도가 프로비타민 A로 기능이 가능한데 그 중 대표적인 것이 β -carotene, α -carotene, cryptoxanthin 등이다. Retinol equivalent (RE)가 가장 높은 것이 β -carotene으로, 6 μ g의 β -carotene이 1 μ g retinol (1 RE)에 상당하며, 비타민 A를 위한 recommended dietary allowance (RDA)가 하루에 1,000 RE, 즉 6 mg의 β -carotene 정도이다 (Giuliano et al. 2000).

비타민 A 보조제로서 β -carotene은 당근 엑기스분이나 β -카로틴 함량이 높은 두나리엘라 등의 미세조류의 건조 분말 형태로 시장에서 kg당 600달러를 호가하고 있는 부가가치가 높은 물질로써 판매되고 있다. 비타민 A는 결핍시 야맹증, 피부 각질화, 안구 건조증, 퇴행성 시력 감퇴, 유아 성장저해 등을 유발하므로 영양강화를 위한 식품 보조제로 마아가린이나 우유 등에 첨가되고 있다. 식품으로써 β -carotene을 함유하는 대표적인 채소인 당근은 가식부 100 g 당 생 것은 7,300 μ g (비타민A 효력 4,100 U), 익힌 것은 8,300 μ g (비타민A 효력 4,600 U)의 카로틴을 함유하고, 풋고추의 경우 2,000 μ g (비타민A 효력 1,100 U), 건고추의 경우 20,000 μ g (비타민A 효력 11,000 U) 정도의 카로틴을 함유하고 있다.

카로티노이드 생합성 경로

카로티노이드 생합성은 1970년대부터 방사능으로 표지된 전구물질을 추적하는 방법과 생합성 단계별로 특이 저해제를 처리하는 방법, 카로티노이드 생합성 변이체들의 특성을 규명하는 방법 등 기본적인 표준 생화학적 분석 방법에 의해 그 경로가 밝혀져 왔다 (Spurgeon and Porter 1980). 생합성 경로에 관여하는 효소 활성 대부분이 *in vitro*에서 측정하기 어려운 단점으로 인해 보다 자세한 연구가 어려웠지만 최근에 카로티노이드 생합성에 관여하는 거의 모든 유전자가 박테리아,

곰팡이 및 식물 등에서 여러 가지 유전공학적 기법을 이용하여 분리됨에 따라 이들 유전자의 특징이 생합성 효소와 생합성 경로의 조절에 대한 새로운 정보를 제공하게 되었다 (Sandmann 1994; Cunningham and Gantt 1998).

식물에서 이소프렌 (isoprene: C_5) 구조를 가지는 isopentenyl pyrophosphate (IPP)와 dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) 물질을 기본단위로 만들어지는 isoprenoid (또는 terpenoid) 물질들은 식물 스테롤 (phytosterol), 병원균 방어물질 (phytoalexin), 광합성 색소 (carotenoid와 chlorophyll의 phytol 일부), 및 ABA와 gibberellin (GA) 같은 식물 호르몬 등으로 역할이 다양하다.

그 중 카로티노이드의 생합성은 acetyl-CoA를 시작 물질로 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR)가 주효소로 관여하는 기존의 mevalonate 경로가 아니라, Figure 1에서 보는 바와 같이, 색소체 내에서 pyruvate와 glyceraldehyde-3-phosphate (GAP)로부터 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP)를 거치는 non-mevalonate 경로 (또는 GAP-pyruvate 경로, DXP 경로, MEP 경로)를 통해 만들어진 IPP와 DMAPP로부터 생합성된다 (Eisenreich et al. 2001). 주로 대장균 (*Escherichia coli*)를 포함하는 진정세균 (eubacteria)과 은행나무 (*Ginkgo biloba*)의 연구를 통해 밝혀진 DXP 경로는 (Rohmer et al. 1993; Arigoni et al. 1997; Lichtenthaler et al. 1997), 먼저, DXP synthase (DXS)에 의해 GAP과 pyruvate의 중합반응으로 형성된 DXP가 DXP reductoisomerase (DXR)에 의한 환원반응으로 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP)라는 branched-chain polyol 구조로 재배치되고, 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase, 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECS) 등 세 종류의 연속효소반응에 의해 nucleotide diphosphate intermediate를 거쳐 cyclic 2,4-diphosphate 구조로 전환된다. 그 이후 반응에 대해서는 아직 자세히 밝혀지지 않은 ring opening, two dehydration, two reduction 을 요구하는 몇 단계의 연속반응에 의해 IPP 또는 DMAPP로 전환된 후 (Rohdich et al. 2001), 탄소 5개의 DMAPP 한 분자에 IPP 세 분자를 연속적으로 첨가시키는 geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS) 촉매반응에 의해 탄소 20개의 diterpene 물질인 geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)가 만들어진다.

본격적인 카로티노이드 생합성 경로는 phytoene synthase (PSY)가 두 분자의 GGPP 중합반응을 촉매하여 탄소 40개의 phytoene (three conjugated double bond) 물질을 합성하면서 시작된다. Phytoene desaturase (PDS)에 의한 두 단계의 불포화 반응 후에 ζ -carotene (seven conjugated double bond)이 만들어지고 ζ -carotene desaturase (ZDS)에 의해 두 단계의 불포화 반응이 더 진행된다면 그 결과 neurosporene (nine conjugated double bond)를 거쳐 lycopene (11 conjugated double bond)이 생성된다 (Bartley and Scolnik 1995; Garcia-Asua et al. 1998).

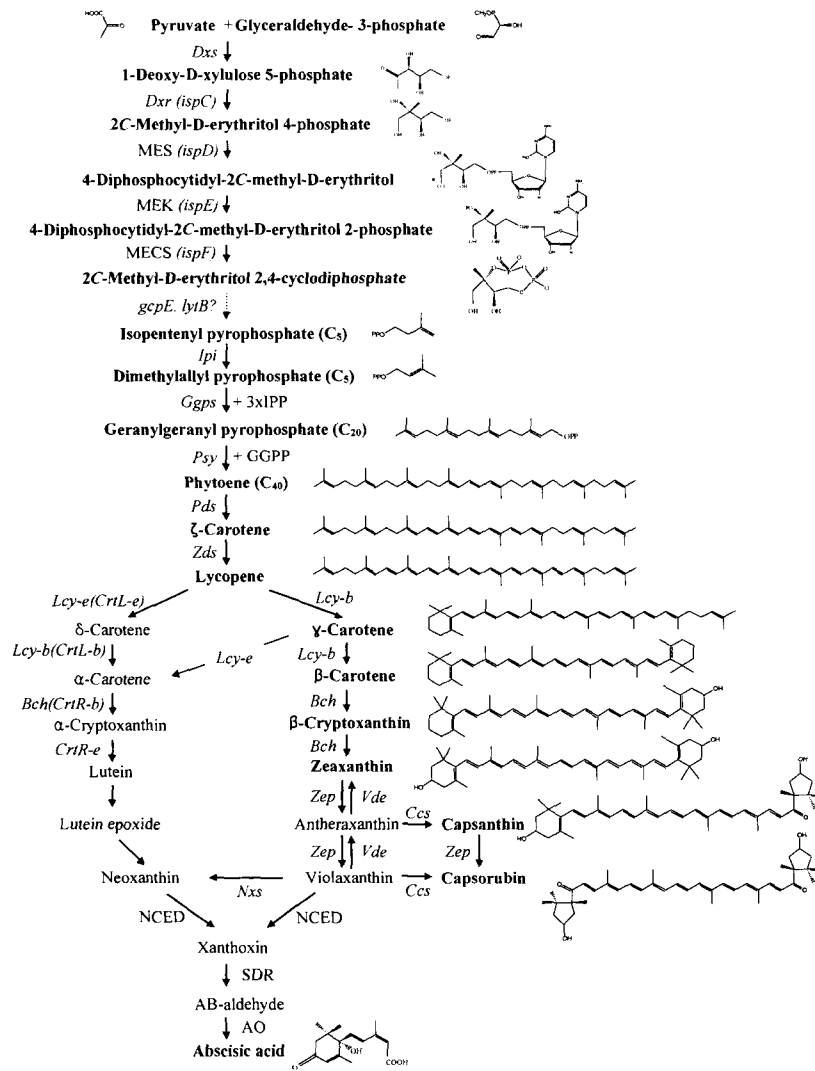


Figure 1. The carotenoid biosynthetic pathways in plants. Abbreviations: AO, aldehyde oxidase; *Bch* (*CrtR-b*), β -ring hydroxylase gene; *CrtR-e*, ϵ -ring hydroxylase gene; *Ccs*, capsanthin/capsorubin synthase gene; *Dxr*, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene; *Dxs*, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene; GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate; *Ggps*, GGPP synthase gene; *Ipi*, IPP isomerase gene; IPP, isopentenyl pyrophosphate; *Meecs*, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; gene *NCED*, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; *Nxs*, neoxanthin synthase gene; *Pds*, phytoene desaturase gene; *Psy*, phytoene synthase gene; SDR, short-chain dehydrogenase/reductase; *Vde*, violaxanthin de-epoxidase gene; *Zds*, ζ -carotene desaturase gene; *Zep*, zeaxanthin epoxidase gene.

비환형 카로티노이드로서 최종물질인 lycopene은 두 종류의 환형 카로틴 물질로 전환되는데, 하나는 lycopene- β -cyclase (β -LCY)의 두 단계 작용에 의해 γ -carotene를 거쳐 만들어지는 β -carotene이고, 다른 하나는 β -LCY와 lycopene- ϵ -cyclase (ϵ -LCY)의 공동작용에 의해 각각 γ -carotene과 δ -carotene을 거쳐 만들어지는 α -carotene이다. 이 두 종류의 카로틴 물질로부터 산화적 유도체인 크산토펴이 합성되는데, β -carotene으로부터 β -carotene hydroxylase (BCH)의 작용에 의해 β -cryptoxanthin을 거치는 두 단계의 수산화 반응에 의해 zeaxanthin이 생성되고, α -carotene으로부터 다른 종류의 hydroxylase (α -carotene hydroxylase)의 작용에 의해 두 개의

수산기가 추가되면 lutein이 생성된다. Zeaxanthin은 zeaxanthin epoxidase (ZEP)에 의해 두 단계의 epoxidation 반응을 거쳐 antheraxanthin과 violaxanthin으로 전환되고, violaxanthin은 violaxanthin de-epoxidase (VDE)에 의해 antheraxanthin을 거쳐 zeaxanthin으로 다시 전환될 수 있다. 이 세 가지 크산토펴 물질이 광 의존적 epoxidation/de-epoxidation cycle (또는 xanthophyll cycle)에 관여하면서 과도한 여기 에너지 조건에서 식물체를 보호하는 광보호의 중요한 역할을 담당하고 있다. 이 중 epoxy-carotenoid의 일종인 antheraxanthin은 capsanthin으로 전환되고 violaxanthin은 capsorubin으로 전환될 수 있는데 이는 고추 카로티노이드 생합성의 마지막 단계인 capsanthin/capsorubin synthase (CCS)의 촉매반응에 의해 가능하다 (Bouvier et al. 1994).

카로티노이드 생합성 경로가 연장되면 lutein epoxide나 violaxanthin으로부터 neoxanthin synthase (NSX)에 의해 만들어지는 3개의 수산기를 가지는 크산토펴 물질인 neoxanthin이 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)에 의해 xanthoxin으로 절단된 후 short-chain dehydrogenase/reductase (SDR)에 의해 abscisic aldehyde가 되고 aldehyde oxidase (AO)에 의해 ABA로 만들어진다 (Seo and Koshiba 2002).

카로티노이드 생합성 관련 유전자

식물에서 카로티노이드 생합성 관련 유전자를 분리하기 위하여 여러 가지 분자생물학적인 방법들이 사용되었다. 우선 단백질을 분리하여 그 특성을 규명한 후 항체를 이용하여 분리하는 방법, *Cyanobacteria* 등 광합성 미생물로부터 분리된 유전자를 프로브로 사용하는 방법, *Erwinia uredobora* 또는 *E. herbicola* 유래의 카로티노이드 생합성 유전자군 (*Crt E, B, I, Y, Z*)으로 functional complementation approach가 가능하게 조작된 *E. coli*를 이용하는 방법 (Misawa et al. 1990; Ausich et al. 1993a; Ausich et al. 1993b), gene tagging에 의해 만들어진 mutant pool로부터 특정 형질이 결손된 식물체를 선발한 후 map-based cloning 등의 방법에 의해 해당 유전자를 찾는 방법, reverse genetics 기술을 이용하여 식물체 내에서 silencing 유도에 의해 나타나는 형질로 유전자의 기능을 밝히는 방법 등

이 사용되었다. 특히, 최근에 IPP와 DMAPP를 만드는 새로운 isoprenoid pathway인 mevalonate-independent pathway 관련 유전자들의 경우, 주로 대장균을 포함한 박테리아와 식물에서 방사능으로 표지된 전구물질을 추적하는 방법에 의해 연구된 후, bioinformatics tool을 이용하여 유전자 배열상의 상동성을

가지는 후보 유전자를 database search를 통해 해당 식물의 EST나 genomic clone들로부터 선발한 후, 미생물 돌연변이주에 complementation 시키거나 미생물에서 발현시켜 *in vivo*에서 활성을 측정하는 방법으로 분리되고 있다 (Table 1).

Table 1. Some cloned genes involved in carotenoid biosynthesis in plants.

Enzyme	Plant	Gene	DNA Clone Type	Accession Number ^a	References
1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)	Arabidopsis	<i>Cla1</i>	cDNA	W43562	Mandel et al. 1996
	Pepper	<i>Tkt2</i>	cDNA	Y15782	Bouvier et al. 1998
	Peppermint	<i>Tkt</i>	cDNA	AF019383	Lange et al. 1998
	Periwinkle	<i>Dxs</i>	cDNA	AJ011840	Chahed et al. 2000
	Tomato	<i>Dxs</i>	cDNA	AF143812	Lois et al. 2000
	Medicago	<i>Dxs1</i>	cDNA	AJ430047	Walter et al. 2002
	Medicago	<i>Dxs2</i>	cDNA	AJ430048	Walter et al. 2002
1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR)	Arabidopsis	<i>Dxr(IspC)</i>	cDNA	AF148852	Schwender et al. 1999
	Peppermint	<i>Dxr</i>	cDNA	AF116825	Lange and Croteau 1999a
	Periwinkle	<i>Dxr</i>	cDNA	AF250235	Veau et al. 2000
	Tomato	<i>Dxr</i>	cDNA	AF331705	Rodriguez-Concepcion et al. 2001
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase	Arabidopsis	<i>IspD</i>	cDNA	AF230737	Rohdich et al. 2000a
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase	Arabidopsis	<i>IspE</i>	Putative orthologue	AF288615	Lange and Croteau 1999b Rohdich et al. 2000b
	Peppermint	<i>Ipk</i>	cDNA	AF179283	
	Tomato	<i>IspE</i>	cDNA	AF263101	
2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECS)	Arabidopsis	<i>IspF</i>	Putative orthologue	AC010852	Veau et al. 2000
	Maize	<i>IspF</i>	Putative orthologue	AI712133	
	Soybean	<i>IspF</i>	Putative orthologue	AW202270	
	Periwinkle	<i>Mecs</i>	cDNA	AF250236	
Geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS)	Arabidopsis	<i>Ggps1</i>	cDNA	L25813	Scolnik and Bartley 1994 ^b Scolnik and Bartley 1995 ^b Scolnik and Bartley 1995 ^b Bartley et al. 1994 Zhu et al. 1997a Zhu et al. 1997b Kuntz et al. 1992 Kuntz et al. 1992 ^b Aitken et al. 1995 ^b Bonk et al. 1997 Bantignies et al. 1995 ^b Takaya et al. 2003
	Arabidopsis	<i>Ggps2</i>	cDNA	U44876	
	Arabidopsis	<i>Ggps3</i>	cDNA	U44877	
	Arabidopsis	<i>Ggps4</i>	genomic DNA	L22347	
	Arabidopsis	<i>Ggps5</i>	cDNA	D85029	
	Arabidopsis	<i>Ggps6</i>	genomic DNA	AB000835	
	Pepper	<i>Ggps</i>	genomic DNA	X80267	
	Pepper	<i>Ggps</i>	cDNA	P80042	
	White lupine	<i>Ggps</i>	cDNA	U15778	
	White mustard	<i>Ggps1</i>	cDNA	X98795	
	Periwinkle	<i>Ggps</i>	cDNA	X92893	
	Hevea	<i>Ggps</i>	cDNA	AB055496	
Phytoene synthase (PSY)	Pepper	<i>Psy</i>	cDNA	X68017	Romer et al. 1993
	Tomato	<i>Psy1(pTom5)</i>	cDNA	Y00521	Ray et al. 1987
	Tomato	<i>Psy1</i>	cDNA	M84744	Bartley et al. 1992
	Tomato	<i>Psy1(GTom5)</i>	genomic DNA	X60441	Ray et al. 1992
	Tomato	<i>Psy2</i>	cDNA	L23424	Bartley and Scolnik 1993
	Tomato	<i>Psy2</i>	genomic DNA	X60440	Ray et al. 1992
	Arabidopsis	<i>Psy</i>	cDNA	L25812	Bartley and Scolnik 1994 ^b
	Daffodil	<i>Psy</i>	cDNA	X78814	Schledz et al. 1996
Phytoene desaturase (PDS)	Pepper	<i>Pds</i>	cDNA	X68058	Huguency et al. 1992
	Tomato	<i>Pds</i>	cDNA	M88683	Giuliano et al. 1993
	Tomato	<i>Pds</i>	genomic DNA	X71023	Mann et al. 1994
	Tomato	<i>Pds</i>	genomic DNA	U46919	Corona et al. 1996
	Arabidopsis	<i>Pds</i>	cDNA	L16237	Scolnik and Bartley 1993 ^b
	Maize	<i>Pds</i>	cDNA	L39266	Hable and Oishi 1995
	Daffodil	<i>Pds</i>	cDNA	X78815	Al-Babili et al. 1996
	Soybean	<i>Pds</i>	cDNA	M64704	Bartley et al. 1991
	Wild tobacco	<i>Pds</i>	cDNA	U19262	Kumagai et al. 1995
	ζ-Carotene desaturase (ZDS)	Arabidopsis	<i>Zds</i>	cDNA	U38550
Maize		<i>Zds</i>	cDNA	AF047490	Luo and Wurtzel 1999

Table 1. (Continued)

Enzyme	Plant	Gene	DNA Clone Type	Accession Number ^a	References
Lycopene- β -cyclase (LCY-B)	Pepper	<i>Lcy-b</i>	cDNA	X86221	Hugueney et al. 1995
	Arabidopsis	<i>Lcy-b</i>	cDNA	U50739	Cunningham et al. 1996
	Tomato	<i>Lcy-b</i>	cDNA	X86452	Pecker et al. 1996
	Tomato	<i>Cyc-b</i>	cDNA	AF254793	Ronen et al. 2000
	Tobacco	<i>Lcy-b</i>	cDNA	X81787	Cunningham et al. 1996 ^c
	Daffodil	<i>Lcy-b</i>	cDNA	X98796	Al-Babili et al. 1996 ^b
Lycopene- ϵ -cyclase (LCY-E)	Arabidopsis	<i>Lcy-e</i>	cDNA	U50738	Cunningham et al. 1996
	Tomato	<i>Lcy-e</i>	cDNA	Y14387	Ronen et al. 1998 ^b
	Potato	<i>Lcy-e</i>	cDNA	AF3211537	Cunningham and Gantt 2001
β -Carotene hydroxylase (BCH)	Pepper	<i>Bch</i>	cDNA	Y09225	Bouvier et al. 1998
	Pepper	<i>Bch2</i>	cDNA	Y09722	Bouvier et al. 1998
	Arabidopsis	<i>Chy1</i>	cDNA	U58919	Sun et al. 1996
	Tomato	<i>CrtR-b1</i>	cDNA	Y14809	Hirschberg 1998
	Tomato	<i>CrtR-b2</i>	cDNA	Y14810	Hirschberg 1998
Zeaxanthin epoxidase (ZEP)	Pepper	<i>Zep</i>	cDNA	X91491	Bouvier et al. 1996
	Arabidopsis	<i>Zep</i>	cDNA	AF281655	Audran et al. 2000 ^c
	Tobacco	<i>Zep</i>	cDNA	X95732	Marin et al. 1996
	Tomato	<i>Zep</i>	cDNA	Z83835	Burbidge et al. 1997
Violaxanthin de-epoxidase (VDE)	Tobacco	<i>Vde1</i>	cDNA	U34817	Bugos et al. 1998
	Arabidopsis	<i>Vde1</i>	cDNA	U44133	Bugos et al. 1998
	Lettuce	<i>Vde1</i>	cDNA	U31462	Bugos and Yamamoto 1996 ^c
Capsanthin/capsorubin synthase (CCS)	Pepper	<i>Ccs</i>	cDNA	X76165	Bouvier et al. 1994
	Pepper	<i>Ccs</i>	genomic DNA	X77289	Deruere et al. 1994
	Pepper	<i>Ccs</i>	genomic DNA	Y14165	Bouvier et al. 1998
	Orange	<i>Ccs</i>	cDNA	AF169241	Xu et al. 1999

^aThe sequences of genes cited in this table could be accessed in the GenBank database.

^bThe genes were only published on gene register of Plant Physiology.

^cThe sequences of genes were directly submitted in the GenBank database.

IPP와 DMAPP의 합성

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)

Mandel 등 (1996)에 의해 엽록체 발생이 초기에 저해됨으로써 클로로필과 카로티노이드 색소가 결핍되고 albino phenotype을 보이는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) *CLA1* mutant가 보고되었다. Lois 등 (1998)에 의해 *E. coli* *Dxs*가 클로닝 된 후 이 *CLA1* mutant에서 결손된 유전자가 바로 애기장대 *Dxs*임이 밝혀졌으나 (Estevez et al. 2000), *CLA1* 유전자의 null mutation에도 불구하고 여전히 클로로필과 카로티노이드가 존재하는 현상이 Araki 등 (2000년)에 의해 두번째 *Dxs* 유전자의 존재로 설명되었다. 새로운 type의 transketolase의 일종인 이 DXS를 코딩하는 유전자는 고추 (*Capsicum annuum*), 박하 (*Mentha* × *Piperita*), 일일초 (*Catharanthus roseus* 또는 *Madagascar periwinkle*), 토마토 (*Lycopersicon esculentum*) 등의 식물에서 한 종류씩 분리되었고 (Bouvier et al. 1998; Lange et al. 1998; Chahed et al. 2000; Lois et al. 2000), 최근에 medicago (*Medicago truncatula*)의 신초와 뿌리 조직에서 다르게 발현되는 두 종류의 유전자가 분리되었다 (Walter et al. 2002).

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR)

DXS는 isoprenoid 뿐만 아니라 thiamine과 pyridoxol의 생합성에도 관여하므로 색소체에서 isoprenoid 생합성을 위한 실질적인 첫 단계 효소는 DXR이다. DXR의 null phenotype은

아직 발견된 적이 없지만 fosmidomycin 항생제가 DXP가 MEP로 전환되는 단계의 유사체로 작용하여 DXR 활성을 특이적으로 저해함이 애기장대에서 확인되었다 (Schwender et al. 1999). *Dxr* 유전자는 박하 (Lange and Croteau 1999a)와 일일초 (Veau et al. 2000)에서 분리되었고, 박하 *Dxr*의 유전자 배열이 토마토의 EST clone (cLEB8M11)으로부터 토마토 *Dxr* 유전자를 분리하는 데 이용되었다 (Rodriguez-Concepcion et al. 2001).

4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase (IspD)

*E. coli*에서 기능이 밝혀져 있지 않았던 YgbP 단백질을 생성을 촉매하는 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase라는 연구 결과가 보고 (Rohdich et al. 1999)된 후 이 유전자를 이용한 BLASTP search에 의해 애기장대의 *IspD* 유전자가 분리되었다 (Rohdich et al. 2000a).

4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase (IspE)

박하의 trichome 조직으로부터 만들어진 cDNA library의 random sequencing 결과를 Prosite database (<http://www.expasy.ch/prosite>)에서 조사한 후 kinase의 GHMP family의 putative ATP-binding domain과 상동성이 높은 클론을 선발하였고 이 isopentenyl monophosphate kinase 유전자 (*IpK*)를 *E. coli*에 발현시켜 DXP 경로의 효소학적 마지막 단계에 관여함이 제시되었다 (Lange and Croteau 1999b). 또한, *E. coli* YchB

단백질의 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 인산화 기능이 밝혀지고 (Luttgen et al. 2000), 이 유전자와 상동성을 가지는 토마토 유전자를 분리하여 *E. coli* 발현시킨 결과, 2번 위치의 수산기를 인산화 시키는 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase임이 증명되었다 (Rohdich et al. 2000b). 박하에서와는 달리 *E. coli* YchB와 토마토 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase는 isopentenyl monophosphate의 인산화 기능은 없는 것으로 밝혀졌다.

2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECS, lspF)

*E. coli*에서 기능이 밝혀져 있지 않았던 YgbB 단백질이 MECS임이 밝혀진 후 (Herz et al. 2000), 이 유전자를 이용한 BLAST search로 옥수수 (*Zea mays*), 콩 (*Glycine max*), 애기장대의 EST 클론들로부터 orthologue 유전자로 예상되는 cDNA 클론들이 확보되었고, 이들간의 아미노산 상동성을 근거로 한 RT-PCR에 의해 일일초 유래의 MECS 유전자가 분리되었다 (Veau et al. 2000).

Phytoene의 합성

Geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS)

카로티노이드 뿐만 아니라 GA와 ABA 등 식물 호르몬과 phyloquinone, plastoquinone, taxol, tocopherol 등에 phytol chain을 공급하는 등 여러 가지 diterpene 물질의 공동 전구체인 GGPP를 합성하는 GGPS는 고추에서 정제된 효소의 항체를 이용하여 고추 cDNA가 분리된 후 (Kuntz et al. 1992), 고추의 단백질 서열을 이용하여 애기장대의 cDNA도 분리되었다 (Bartley et al. 1994). 애기장대의 경우 최근까지 6종의 서로 다른 종류의 GGPS 유전자가 분리됨으로써 각각의 유전자가 상이한 최종 산물을 생성하는데 관련되어 있을 가능성과 더불어 GGPS가 이들의 합성을 위한 복잡한 조절 point일 가능성이 제시되었다 (Bartley and Scolnik 1995; Zhu et al. 1997a; Zhu et al. 1997b).

Phytoene synthase (PSY)

Ray 등 (1987)에 의해 토마토 과실 숙성 특이 pTOM5 유전자가 분리된 후, reverse genetics 방법을 이용하여 antisense로 형질전환시킨 토마토의 과실과 꽃에서 카로티노이드가 현저히 감소하였는데 (Bird et al. 1991; Bramley et al. 1992), *Psy*에 해당하는 미생물 유전자 *CrtB* 변이 *R. capsulatus*에 complementation 시키는 실험을 통해 *Psy* 유전자임이 증명되었고, 토마토 앞에서 *Psy2* 유전자가 분리된 후에 pTOM5 유전자는 *Psy1* 유전자로 명명되었다 (Bartley and Scolnik 1993). 이 유전자는 담배와 토마토에 형질전환 시 예상대로 GA 수준을 감소시킴으로서 왜성형질 (dwarfism)을 초래하였다 (Fray et al. 1995). 현재까지 애기장대를 비롯하여 고추와 수선화

(*Narcissus pseudonarcissus*)에서 각 한 종류의 *Psy* 유전자가 분리되어 있다 (Romer et al. 1993; Schledz et al. 1996).

Lycopene 합성

Phytoene desaturase (PDS)과 ζ-carotene desaturase (ZDS)

최초의 lipophilic 카로티노이드인 phytoene은 두 종류의 desaturase 유전자인 *Pds*와 *Zds*에 의해 lycopene으로 전환된다. 박테리아, 곰팡이, 식물 유래 PDS 효소는 조효소로 FAD와 결합하는데 필요한 전형적인 pyrimidine dinucleotide binding domain을 포함하고 있으며, 정제된 고추 PDS 경우 FAD와 결합하는 것이 보고되었다 (Hugueney et al. 1992). PDS 유전자는 norflurazon 제초제에 저항성 형질을 보이는 *Cyanobacteria* 변이주로부터 1990년에 처음 분리된 후 이를 프로브로 콩 유전자가 분리되었다 (Bartley et al. 1991). 현재까지 토마토와 고추, 애기장대, 옥수수, 수선화, 담배 등 여러 식물에서 분리되었다 (Giuliano et al. 1993; Pecker et al. 1992; Hugueney et al. 1992; Al-Babili et al. 1996; Kumagai et al. 1995). 이 중 토마토 *Pds*의 프로모터는 잎의 카로티노이드 성분에는 변화를 주지 않고 꽃과 과실 같이 잡색체를 지닌 조직에서만 발현되도록 유도할 때 유용할 것으로 제시되었다 (Corona et al. 1996; Mann et al. 2000). ZDS 유전자는 *E. coli*-complementation assay에 의해 *Cyanobacteria*에서 1993년 분리된 후, 애기장대와 옥수수 등 식물 유전자의 분리에 유용하게 사용되었다.

Carotene 합성

Lycopene-β-cyclase (LCY-B)와 lycopene-ε-cyclase (LCY-E)

*Cyanobacteria*에서 분리된 유전자 (*CrtL*)가 *E. coli*-complementation assay에 의해 β-LCY로 밝혀진 후 (Cunningham et al. 1993) 식물 orthologue 유전자 분리에 프로브로 이용되었다. 애기장대에서 각각 single copy로 존재하는 두 종류의 cyclase 유전자 (*Lcy-b*와 *Lcy-e*)가 모두 분리되어 카로티노이드 구조의 환 형성 기작 연구에 사용되었고 (Cunningham et al. 1996), 토마토에서 과실 숙성기간 동안 유전자의 발현이 감소하는 β-LCY 유전자 (*Lcy-b* 또는 *CrtL-b*)가 분리되었다 (Pecker et al. 1996). 토마토 변이체 중 *Delta*는 ε-LCY 유전자 (*Lcy-e* 또는 *CrtL-e*)의 과발현 변이체로서 δ-carotene이 축적되었고 (Ronen et al. 1999), 잡색체에서 특이적으로 발현하는 β-LCY 유전자 (*Cyc-b*)는 과발현 변이체인 *Beta*와 null 변이체인 *Old-gold*로부터 map-based cloning에 의해 분리되었다 (Ronen et al. 2000). 최근에 감자 *Lcy-e*도 카로티노이드 ring number 결정에 관여함이 규명되었다 (Cunningham and Gantt 2001).

LCY-B는 LCY-E와 30%, CYC-B와 53%의 낮은 아미노산 상동성을 보이는 반면 고추에서 분리된 CCS와 86.1%의 높은 상동성을 보였고, NXS를 포함한 이들 식물 cyclase 들은

모두 *Cyanobacteria*의 *CrtL*로부터 진화되었을 것으로 추정되었다. 고추에서는 과실 숙성기간 동안 구성적으로 발현되는 *Lcy-b*가 분리되었고 (Huguency et al. 1995), 수선화에서 분리된 *Lcy-b*는 golden rice 개발에 사용되었다.

Xanthophyll 합성

β -Carotene hydroxylase (BCH)

카로틴 물질들로부터 산화적 유도체인 크산토펴을 만드는 BCH 유전자는 고추에서 cDNA를 *E. uredoovora* 유래의 *Crt* 유전자군 중 *E, B, I, Y*를 가짐으로써 β -carotene을 생성하도록 조작된 *E. coli*에 형질전환시켜 그 산물을 HPLC로 확인하는 방법에 의해 두 종류가 분리되었다 (Bouvier et al. 1998). 토마토에서는 green tissue에서 발현되는 것과 꽃에서 특히 강하게 발현되는 두 종류가 보고되었고 (Hirshberg 2001), 최근 애기장대의 full genome sequence가 밝혀지면서 애기장대에서도 두 종류가 존재함이 제시되었다. ϵ -ring hydroxylase를 코딩하는 유전자는 아직 밝혀지지 않고 있다.

Zeaxanthin epoxidase (ZEP)

ZEP 유전자는 transposon tagging에 의해 만들어진 애기장대와 담배의 변이체들로부터 map-based cloning 기술을 이용하여 분리된 후, 이를 프로브로 고추의 숙과에서 더 강하게 발현되는 *Zep*가 분리되었다 (Bouvier et al. 1996). 이 고추 유전자를 *E. coli*에 과발현시켜 β -ring을 가지는 크산토펴에 특이적으로 작용하는 효소적 특성을 규명하였고, wilt-related 토마토의 *Zep*도 분리되었다 (Burbidge et al. 1997).

Violaxanthin de-epoxidase (VDE)

VDE 유전자는 상추 (*Lactuca sativa*)에서 처음 분리되었고 (Bugos and Yamamoto 1996), 애기장대 변이체중 크산토펴 회로가 결손된 non-photochemical quenching 1 (*npq1*)이 *Vde* null mutant임이 밝혀졌다 (Niyogi et al. 1998). 이 애기장대 *Vde1*과 담배 *Vde1*는 식물에서 발견된 최초의 lipocalin 계열 중의 하나로 규명되었다 (Bugos et al. 1998).

Capsanthin/capsorubin synthase (CCS)

5, 6-Epoxycarotenoid인 antheraxanthin과 violaxanthin을 고추 적색 색소물질인 capsanthin과 capsorubin으로 전환시키는 bifunctional enzyme인 CCS는 우선 고추의 잡색체로부터 효소를 정제한 후 항체를 만들어 cDNA screening에 사용하였다 (Bouvier et al. 1994). CCS 유전자는 과실 숙성기간 동안 특이적으로 발현될 뿐만 아니라 *Ggps, Psy, Pds, Lcy, Zep* 등의 고추 카로티노이드 유전자들과 함께 여러 종의 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)에 의해 강하게 유도되어 ROS가 카로티노이드 합성을 매개하는 second messenger의 일종임이 보고되었다 (Bouvier et al. 1998). 고추 과실의 숙성 과정에서

mevalonate pathway의 주효소인 HMGR과 farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) 유전자의 발현은 유도되지 않고 카로티노이드 생합성 효소인 GGPS, PSY, PDS 유전자의 발현이 그 순서대로 유도되며 고추 숙과에서는 이들의 전사체가 최소한 2종 이상임이 제시되었다 (Ha et al. 1999).

*Ccs*가 결손된 yellow 고추의 경우 capsanthin과 capsorubin이 생성되지 않고 전체 카로티노이드 양 역시 매우 적고, 일부 mutant에서는 상당한 양의 lutein이 발견되기도 한다. 이는 선형 카로티노이드인 lycopene이 β -carotene pathway로 들어가기 위한 specific channeling에 β -LCY와 더불어 CCS가 동반작용을 하는 것이 아닐까 추측되기도 했다 (Huguency et al. 1995). 다양한 숙과색의 고추 유전자원을 이용하여 HPLC를 이용한 카로티노이드 조성 및 함량 분석 치와 northern blot 분석을 통한 카로티노이드 생합성 유전자들의 발현도와의 상관관계를 비교해 본 결과에서는 일반적으로 과실이 숙성됨에 따라 카로티노이드 함량이 급격히 증가되는 적색 고추에 비해 숙과색이 미색, 황색, 주황색, 살구색인 고추의 경우는 미숙과에 비해 전체 카로티노이드의 양이 증가되지 않았다. 숙과색이 살구색 이상, 즉 주홍색, 적색, 흑적색 등의 고추에서만 capsanthin이 생성되었고 이는 capsanthin의 생성과 카로티노이드 축적 시스템의 상관관계를 제시함은 물론, PSY와 PDS 유전자의 공동 발현과 CCS 유전자의 강한 발현이 과량의 카로티노이드 생성 및 축적에 요구됨이 제시되었다 (Ha et al. unpublished).

Abscisic acid (ABA) 합성

ABA 생합성 특이경로는 zeaxanthin을 all-trans-violaxanthin으로 바꾸는 ZEP 관여 단계부터 시작된다. ABA 결손 변이체 중에서 선발된 애기장대의 *aba1*과 담배 (*Nicotiana plumbaginifolia*) *aba2*의 경우 *Zep* 유전자가 손상된 결과로 밝혀졌다 (Marin et al. 1996). all-trans-violaxanthin을 all-trans-neoxanthin으로 바꾸는 NXS의 경우 감자 (*Solanum tuberosum*)와 토마토에서 *Ccs*와 *Cyc-b*의 paralog로서 발견되었으나 (Al-Babili et al. 2000; Bouvier et al. 2000), all-trans-violaxanthin을 9-cis-violaxanthin 또는 9-cis-neoxanthin으로 전환하는데 필요한 효소 유전자는 아직 발견되지 않고 있다. 9-cis-epoxycarotenoid로 전환된 크산토펴 물질은 NCED에 의해 산화적인 절단 반응에 의해 xanthoxin으로 만들어진다. 1997년 옥수수 변이체 중 선발된 *Viviparous 14* (*vp14*)가 NCED에 해당됨이 1999년 밝혀졌고, 비슷한 시기에 토마토 변이체 *notabilis*로부터 *Vp14*-related 유전자인 *Nced1*이 분리되었다. 2001년 애기장대에서 NCED 유전자의 조작에 의해 내한성 조절 가능성이 연구되면서 NCED가 ABA 생합성의 주효소임이 밝혀졌다 (Seo and Koshiba 2002).

애기장대 ABA 결손 변이체 중 *aba2*와 *aba3*의 경우, 색소체에서 만들어진 xanthoxin 물질이 세포질에서 ABA로 전환

되는 단계가 손상되어 있었는데 각각 xanthoxin으로부터 abscisic aldehyde를 생성하는 SDR과 abscisic aldehyde을 ABA로 만드는 AO에 해당되는 유전자인 것으로 1997년 밝혀졌고, 1998년 담배 *aba1*의 경우도 동일한 유전자 부위가 손상된 결과였다. Xanthoxin으로부터 ABA가 만들어지는 세포질에서의 최종 몇 단계의 과정은 아직 완전히 확립되지 않았고, SDR과 AO의 작용 순서가 바뀌어 AO가 먼저 작용할 경우 xanthoxic acid를 거쳐 ABA를 만드는 경로와 abscisic alcohol을 거치는 또 다른 경로도 가능할 것으로 예측되고 있다 (Seo and Koshiba 2002).

카로티노이드 대사공학

카로티노이드의 성분 및 함량을 변화시킴으로써 식물의 영양학적 가치를 증진시키려는 노력은 여러 가지 다양한 접근 방법에 의해 시도되어 왔다. *E. coli*와 yeast 등 *in vivo* system에서 카로티노이드 대사공학의 가능성은 이미 검증되어 있었고 (Misawa and Shimada 1998), 식물 형질전환을 통한 카로티노이드 대사공학은 특히 최근 몇 년간에 큰 성과를 이루었다. 그 대표적인 예가 벼 배유, 유채 (*Brassica napus*) 종자, 토마토 과실에서 β -carotene (provitamin A)의 함량이 증가된 것과 비식물 유래 카로티노이드인 astaxanthin을 담배 꽃에서 생성시킨 것 등이다.

현재까지 식물에서 카로티노이드 대사공학의 방향은 다음의 네 가지 목적을 두고 접근되어 왔다. 첫 번째, 토마토에서 기존 카로티노이드의 성분을 다른 카로티노이드 성분으로 대사경로를 shifting 하는 것. 두 번째, 당근의 뿌리와 유채 종자에서처럼 기존의 카로티노이드 함량을 전체적으로 증가시키는 것. 세 번째, 벼 배유처럼 카로티노이드가 없는 조직에서 카로티노이드 생합성 경로를 만드는 것. 마지막으로 식물에 존재하지 않는 미생물 카로티노이드를 식물에서 생성시킨 것 등이다.

Tomato

토마토 카로티노이드의 주성분인 lycopene은 암 예방, 암 치료시 면역기능 향상, 심장질환 예방, 당뇨병의 진행 저지 효과 등의 기능성이 보고됨에 따라 식물에서 카로티노이드 대사공학을 위한 유전자 조작의 노력은 주로 토마토에서 시도되었다. 카로티노이드 대사의 시작 물질인 phytoene의 생합성 유전자 *Psy*를 anti-sense로 도입하여 silencing을 유도시킨 결과 예상대로 카로티노이드 생합성이 전체적으로 저해되었고 (Bramley et al. 1992), 토마토 과실 특이 polygalacturonase (PG) 프로모터에 *Psy*를 sense와 anti-sense로 각각 도입하여 lycopene 생성 촉진에 의한 deep red color와 lycopene 생성 저해에 따른 attractive yellow color의 결과를 낳았다 (Bird et al.

1994). *Psy*의 발현 수준을 높임으로써 전체 카로티노이드 함량을 증진시키려는 시도는 식물 호르몬 GA의 합성을 위한 GGPP까지 카로티노이드 합성으로 유입됨으로 인해 원치 않았던 왜성 형질의 출현을 낳았고 (Fray et al. 1995), *Psy*의 발현을 높인 다른 시도에서는 내재 *Psy*까지 공동저해 시킴으로써 카로티노이드 합성의 전체적인 저하를 초래하는 등 난관을 거듭하였다. Fraser 등 (2002)은 토마토 과실 특이 PG 프로모터에 토마토 *Psy1*의 transit peptide를 붙인 박테리아 유래의 *CrtB*를 과다발현 시킨 결과, phytoene, lycopene, β -carotene의 함량이 각각 2.4배, 1.8배, 2.2배 증가되었음은 물론 전체 카로티노이드 양은 2~4배 더 높아졌다. 이는 토마토 내재 *Psy*와 35% 이하의 상동성이 낮은 박테리아 유전자를 이용함으로써 gene silencing을 회피하였고, PG 프로모터를 사용하여 도입 유전자를 과실의 숙과에서만 발현되도록 temporal expression을 유도함으로써 가능한 결과였다.

Misawa 등 (1994)은 식물에서는 PDS와 ZDS가 관여하는 네 단계의 불포화 반응을 단독으로 수행하는 *Erwinia* 유래의 *CrtI* 유전자를 담배에 형질전환 시킴으로써 PDS를 저해하는 제초제인 norflurazon에 저항성인 형질을 부여하였다. 이 *CrtI* 유전자를 완두 ribulose biphosphate carboxylase small subunit의 transit peptide를 연결 (*35S::tp::CrtI*)하여 토마토에 형질전환한 결과 lycopene 성분과 전체 카로티노이드 함량이 증가되지 않은 예상치 못한 결과에도 불구하고 β -carotene 함량이 전체 카로티노이드의 45% (5 mg/100 g fresh weight)에 달하는 긍정적인 결과를 낳았다 (Romer et al. 2000). 이 *CrtI* 토마토에서 내재 *Psy*의 발현도는 저해되었을 뿐 아니라 phytoene 함량도 줄어들었으나 *Pds*, *Zds*, β -*Lcy*의 발현도는 각각 1.4배, 2.5배, 1.7배 증가하였고 최종적으로 β -carotene 함량은 비형질전환체에 비해 3.5배 증가되었다.

토마토 과실 특이 발현을 유도하는 *Pds*의 프로모터에 애기장대 β -*Lcy*를 sense로, 토마토 β -*Lcy*를 anti-sense로 연결하여 형질전환시킨 토마토 형질전환체 각각의 과실에서 카로티노이드의 함량이 약간씩 증가된 결과를 낳았다 (Rosati et al. 2000). 특히 β -*Lcy* up-regulation용 sense construction의 경우 β -carotene의 양이 7배 정도 증가됨에 따라 red의 토마토 과색이 orange-red 또는 orange로 바뀌는 phenotype의 변화를 보였고, β -*Lcy* down-regulation용 anti-sense construction의 경우 β -*Lcy*의 발현이 50% 정도 저해되었고 lycopene의 양도 다소 증가하였다.

Carrot과 golden canola

영양학적으로 프로비타민 A의 주 공급원인 당근에서 β -carotene을 포함한 전체 카로티노이드 함량을 높이려는 노력은 뿌리 특이 발현 유도 프로모터에 *E. herbicola* 유래의 *PSY*를 코드하는 *CrtB*를 형질전환함으로써 시도되었다. 그 결과 lycopene이나 β -carotene 등 카로티노이드 조성에는 큰 변화

가 없이 전체 카로티노이드 함량이 1.7배에서 5.3배까지 증가되었다 (Hauptmann et al. 1997). 유채 종자의 oil 조성을 개선하려는 노력의 일환으로 *Brassica* 유래의 종자 특이 napin 프로모터에 transit peptide와 *E. uredoovora* 유래의 *CrtB*를 연결 (*Np::tp::CrtB*)시켜 형질전환시킨 결과, 유채의 배 색깔이 오렌지로 바뀐 것은 물론 전체 카로티노이드 양은 50배, β -carotene은 500배 (이는 palm oil의 β -carotene 함량과 유사한 수준)까지 증가되었고, 지방산 조성에서도 18:2 (linoleic acid)와 18:3 (linolenic acid)의 비율은 줄어들고 18:1 (oleic acid)의 비율은 증가하였다 (Shewmaker et al. 1999). 수선화의 *Psy*를 벼 종자에서 발현시킨 golden rice의 경우 phytoene 까지만 생성이 유도되는 데 비해 박테리아 유래의 *CrtB*를 종자에서 발현시킨 유채의 경우 β -carotene은 물론 α -carotene까지 생성이 유도되었다 (Giuliano et al. 2000).

Golden rice

Burkhardt 등 (1997)에 의해 광합성 능력이 없고 카로티노이드가 생성되지 않는 식물 조직에서 프로비타민 A인 β -carotene을 합성하기 위한 첫 걸음이 보고되었다. 벼 endosperm-specific glutelin 프로모터 *Gt1*에 수선화 *Psy*를 연결하여 벼에 형질전환시킨 후 그 미숙 종자의 배유를 방사능 [^{14}C]으로 표지한 기질들 (IPP와 GGPP)과 반응하여 비형질전환체에서 없었던 phytoene 성분이 검출된 것이다. 3년 후 같은 그룹에 의해 *Gt1::Psy/35S::tp::CrtI*와 *Gt1::Lcy*의 이중 형질전환에 의해 벼 종자의 색깔이 황금색으로 변한 golden rice가 보고되었다 (Ye et al. 2000).

이전 보고에 비해 *E. uredoovora* 유래의 *CrtI*와 수선화의 β -*Lcy*가 추가된 이 연구 결과에 의하면 β -*Lcy*가 이중 형질전환되었을 때 β -carotene의 생성 양이 늘어나긴 하지만 *Psy*와 *CrtI*만으로도 예상했던 카로티노이드 산물인 lycopene보다 down pathway의 카로티노이드 성분들 (β -carotene, α -carotene, lutein, zeaxanthin)이 생성됨이 밝혀졌다. 이 사실은 LCY-B, LCY-E, BCH 등의 효소들이 벼 종자의 endosperm에서 구성적으로 발현되고 있거나 일단 생성된 lycopene에 의해 이 효소들의 발현이 자동적으로 유도되는 게 아닌가 설명되었다.

쌀을 주식으로 하는 아시아, 아프리카, 라틴 아메리카 등 최소한 26개국 이상의 나라, 특히 서남아시아의 5세 이하 어린이의 70%가 비타민 A 결핍증 (avitaminosis A)에 의해 고통을 받고 있다는 점에서 이 연구는 주목받았으며, United Nations Children's Fund (UNICEF)에 의하면 영양학적으로 증가된 비타민 A 함량에 의해 매년 1세에서 4세 사이의 어린이 100~200만 명이 목숨을 구할 것이라고 예측되었다. Golden rice의 β -carotene 함유량이 쌀 100 g당 200 ug 정도라고 볼 때, 매일 쌀 300 g으로부터 RDA 기준의 1/10 정도의 프로비타민 A를 섭취하게 되는 것이다 (Giuliano et al. 2000).

Tobacco

Tobamovirus subgenomic promoter를 이용하여 고추 유래 *Ccs*를 담배의 잎절편에 transfection 시킨 실험에서는 capsanthin 함량이 전체 카로티노이드의 36%까지 증가된 결과 담배의 잎 색깔이 오렌지로 변하였으나 전체 카로티노이드의 증가 없이 잎의 주요 크산토펜 성분의 감소만이 초래되었을 뿐 아니라 잡색체 내 특별한 카로티노이드 축적 구조인 lipoprotein fibril에 축적되어야 할 capsanthin 성분이 엽록체에 축적되면서 thylakoid membrane의 구조 이상과 grana staking의 감소를 야기시켰다 (Kumagai et al. 1998).

대사공학 기술을 이용하여 식물에는 존재하지 않는 미생물 유래의 카로티노이드를 식물에서 생성해보려는 노력이 Mann 등 (2000)에 의해 시도되었다. 카로티노이드 중 상업적 가치가 가장 뛰어난 astaxanthin은 alga인 *Haematococcus pluvialis* 유래의 적색색소로서 β -carotene ketolase를 coding하는 *CrtO*에 의해서 zeaxanthin 등으로부터 생성될 수 있다 (Lotan and Hirschberg 1995). 토마토 *Pds*의 프로모터와 transit peptide에 *CrtO*를 결합하여 담배에 형질전환 시킨 결과 담배 꽃의 밀선 구조 (nectary)의 색깔이 astaxanthin 등 여러 종류의 ketocarotenoid의 축적에 의해 적색으로 변했다. 이 시도는 과색과 화색을 유전자 조작을 통해 변경시키려는 원에 분야 연구에 플랫폼 기술로서 제공될 수 있을 것으로 제시되었다.

결론

식물을 인간에게 유용한 방향으로 그 형질을 개선하려는 육종 목표는 주로 생산성 증진과 병해충이나 재해 등 외부 환경적 요건에 대한 적응력을 강화시키는 방향으로 진행되어 왔다. 그러나 최근 몇 년간 선진국에서의 고영양성, 고기능성 식품의 인기와 저개발국가에서의 필수영양소 부족에 의한 국민 건강에의 위협을 극복하려는 노력의 일환으로 식물체 내 재 대사과정을 유전자조작을 통해 조절함으로써 식물의 nutritional quality를 증진시키거나 변경하려는 현대적인 육종 방법으로서의 대사공학 연구가 활발히 진행되고 있다. 필수 아미노산, 지방산, 미네랄, 비타민 A, B, C, E, 그리고 isoprenoid, flavonoid, alkaloid 등의 여러 가지 생리 활성을 가지는 2차 대사산물을 포함하는 phytonutrient가 그 대상물질로서 생화학, 유전학, 분자생물학, 유전체 연구 등 가능한 모든 연구 분야를 총망라하여 영양학적으로 가치가 있는 물질을 식물체 내에서 생성해 보려는 nutritional genomics 시대가 도래했다고 볼 수 있다.

그 중에서 비타민 A 전구체로서의 카로티노이드 증진 연구는 그 생합성 과정이 비교적 자세히 밝혀져 있을 뿐 아니라 미생물과 식물의 다양한 source로부터 거의 모든 생합성 관련 유전자들이 분리되었기에 유전자 조작에 의한 대사공학에의

접근이 비교적 용이하게 되었고 그 결과, 최근 몇 년간 토마토, 유채, 벼 등의 식물에서 카로티노이드 대사공학의 성공적인 몇몇 시도가 보고되기에 이르렀다. 특히 이들은 식물의 조직 특이 프로모터를 사용함으로써 초기의 카로티노이드 대사공학이 식물호르몬 GA 등 다른 isoprenoid 물질로의 대사 흐름을 방해함으로써 야기되었던 원치 않는 형질의 문제를 극복하였다. 비교적 일차 대사율이 낮은 종자나 과일 등의 조직에서만 특이적으로 카로티노이드 생합성을 유도함으로써 가능한 결과였다.

하지만, 이제까지 시도되었던 카로티노이드 대사공학의 결과를 종합해 보면, terpene 전구체의 공급은 여전히 bottle neck으로 남아있고, 생성된 카로티노이드의 식물체내 storage capacity 또한 고려되어야 할 부분이다. 이런 문제를 극복하려면, 주로 식물의 *Psy*, *Pds*, *Lcy-b*와 미생물 *CrtB*, *CrtI*에 국한되어 사용되었던 카로티노이드 생합성 유전자의 종류를 plastid내에서 IPP와 DMAPP를 공급하는 것으로 밝혀진 DXP pathway 관련 유전자들로 확대해야 함은 물론, Deruere 등 (1994)에 의해 고추의 잠색체에서 다량의 카로티노이드 축적을 위해 발달된 고분자 lipoprotein 구조인 fibril의 assembly 기작에도 관심을 가져야 할 것이다. 더 나아가 전체 카로티노이드 함량을 증진시키거나 특정 카로티노이드 성분 쪽으로 대사의 흐름을 바꾸는 데는 좀 더 정교한 대사 변경 기술이 요구되고 있으나 아직까지는 식물 내재 카로티노이드 생합성 유전자들의 발현이 어떻게 조절되고 있는지에 대한 지식은 부족한 실정이다. 특히 외래 카로티노이드 생합성 유전자를 추가로 발현시킬 경우 내재 유전자의 발현은 아직까지 예측하기 어려운 실정이며, 식물 유전자와 상동성이 낮은 미생물 유래의 유전자를 사용하는 것이 내재 유전자의 co-suppression을 막는데 어느 정도 긍정적 효과를 미치지 않을까 제시되기도 하였다 (Fraser et al. 2002).

식물마다 축적되는 카로티노이드의 주성분이 다른 만큼 생합성 조절 기작도 다를 것으로 예상되고, 식물의 전체 대사경로가 일차대사와 이차대사 산물의 상호 전환 및 여러 단계의 복잡한 조절 기작으로 얽혀있다는 점을 주목해 볼 때 비교적 생합성 경로가 자세히 밝혀진 있는 카로티노이드가 복잡한 식물체 내 대사조절 연구를 위한 model pathway로서 제공될 수 있을 것이다. 카로티노이드, 좀더 나아가 isoprenoid의 내재 생합성 조절 기작을 해명하고 인위적인 유전자 조작을 통해 대사물질의 흐름을 조절해 봄으로써 이들의 생합성 경로에 대한 전반적인 이해에 좀 더 접근할 수 있지 않을까 기대해 본다.

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업단에 의해 일부 지원되었음.

인용문헌

- Al-Babili S, Huguency P, Schledz M, Welsch R, Frohnmeyer H, Laule O, Beyer P (2000) Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. FEBS Lett 485: 168-172
- Al-Babili S, Lintig J, Kleinig H, Beyer P (1996) A novel soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinilation, membrane association and enzymatic activation. Plant J 9: 601-612
- Araki N, Kusumi K, Niwa Y, Iba K (2000) Temperature-sensitive Arabidopsis mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. Physiol Plant 108: 19-24
- Arigoni D, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. Proc Natl Acad Sci USA 94: 10600-10605
- Ausich RL, Brinkhaus FL, Mukharji I, Proffitt JH, Yarger JG, Yen HB (1993a) Beta-carotene biosynthesis in genetically engineered hosts. US patent 5530188
- Ausich RL, Brinkhaus FL, Mukharji I, Proffitt JH, Yarger JG, Yen HB (1993b) Biosynthesis of zeaxanthin and glycosylated zeaxanthin in genetically engineered hosts. US patent 5684238
- Bartley GE, Scolnik PA (1993) cDNA cloning, expression during development and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. J Biol Chem 268: 25718-25721
- Bartley GE, Scolnik PA (1995) Plant carotenoid: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. Plant Cell 7: 1027-1038
- Bartley GE, Scolnik PA, Giuliano G (1994) Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 45: 287-301
- Bartley GE, Vitonen PV, Bacot KO, Scolnik PA (1992) A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. J Biol Chem 267: 5036-5039
- Bartley GE, Vitonen PV, Pecker I, Chamovitz D, Hirschberg J, Scolnik PA (1991) Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. Proc Natl Acad Sci USA 88: 6532-6536
- Bird CR, Grierson D, Schuch W (1994) Process for modifying the production of carotenoids in plants, and DNA, constructs and cells therefor. US patent 575086
- Bird CR, Ray JA, Fletcher JD, Boniwell JM, Bird AS, Teulieres C, Blain I, Bramley PM, Schuch W (1991) Using antisense RNA to study gene function: inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. Bio/Technology 9: 635-639

- Bonk M, Hoffmann B, Von Lintig J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleinig H, Beyer P (1997) Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur J Biochem* 247: 942-950
- Bouvier F, Backhaus RA, Camara B (1998) Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J Biol Chem* 273: 30651-30659
- Bouvier F, Camara B, Kuntz M (2000) Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol* 18: 666-669
- Bouvier F, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kumagai MH, Camara B (2000) Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur J Biolchem* 267: 6346-6352
- Bouvier F, d'Harlingue A, Huguene P, Marin E, Marionpoll A, Camara B (1996) Xanthophyll biosynthesis-cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J Biol Chem* 271: 28861-28867
- Bouvier F, d'Harlingue A, Suire C, Backhaus RA, Camara B (1998) Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol* 117: 1423-1431
- Bouvier F, Huguene P, d'Harlingue A, Kuntz M, Camara B (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5, 6-epoxy-carotenoid into ketocarotenoid. *Plant J* 6: 45-54
- Bouvier F, Keller Y, d'Harlingue A, Camara B (1998) Xanthophyll biosynthesis: Molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylase from pepper fruits. *Biochim Biophys Acta* 1391: 320-328
- Bramley P, Teulieres C, Blain I, Brid C, Schuch W (1992) Biochemical characterization of transgenic tomato plants in which carotenoid synthesis has been inhibited through the expression of antisense RNA to pTOM5. *Plant J* 2: 343-349
- Bugos RC, Hieber AD, Yamamoto HY (1998) Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *J Biol Chem* 273: 15321-15324
- Bugos RC, Yamamoto HY (1996) Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6320-6325
- Burbidge A, Grieve T, Terry C, Corlett J, Thompson A, Taylor I (1997) Structure and expression of a cDNA encoding zeaxanthin epoxidase, isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Exp Bot* 48: 1749-1750
- Burkhardt PK, Beyer P, Wunn J, Kloti A, Armstrong GA, Schledz M, von Lintig J, Potrykus I (1997) Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J* 11: 1071-1078
- Chahed K, Oudin A, Guivarc'h N, Hamdi S, Chenieux JC, Rideau M, Clastre M (2000) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid-producing cells. *Plant Physiol Biochem* 38: 559-566
- Corona V, Aracri B, Kosturkova G, Bartley GE, Pitto L, Giorgetti L, Scolnik PA, Giuliano G (1996) Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during tomato development. *Plant J* 9: 505-512
- Cunningham FX Jr, Chamovitz D, Misawa N, Gantt E, Hirschberg J (1993) Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of β -carotene. *FEBS Lett* 328: 130-138
- Cunningham FX Jr, Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid Biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 557-583
- Cunningham FX Jr, Gantt E (2001) One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ϵ -cyclases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2905-2910
- Cunningham FX Jr, Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996) Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8: 1613-1626
- Deruere J, Bouvier F, Steppuhn J, Klein A, Camara B, Kuntz M (1994) Structure and expression of two plant genes encoding chromoplast-specific proteins: occurrence of partially spliced transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1144-1150
- Deruere J, Romer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B (1994) Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supermolecular lipoprotein structure. *Plant Cell* 6: 119-133
- Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* 6: 78-84
- Estevez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jimenez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y, Leon P (2000) Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124: 95-103
- Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1092-1097
- Fray RG, Wallace A, Fraster PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J* 8: 693-701
- Giuliano G (2000) Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* 24: 413-420
- Giuliano G, Aquilani R, Dharmapuri S (2000) Metabolic engineering

- of plant carotenoids. *Trends Plant Sci* 5: 406-409
- Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5: 379-387
- Gracia-Asua G, Lang HP, Cogdell RJ, Hunter CN (1998) Carotenoid diversity: a molecular role for the phytoene desaturase step. *Trends Plant Sci* 3: 445-449
- Ha SH, Lee SW, Kim JG, Hwang YS (1999) The expression of genes involved in carotenoid biosynthesis in pepper. *Agric Chem Biotechnol* 42: 92-96
- Hauptmann R, Eschenfeldt WH, English J, Brinkhaus FL (1994) Enhanced carotenoid accumulation in storage organs of genetically engineered plants. US patent 5618988
- Herz S, Wungsintaweekul J, Schuhr CA, Hecht S, Luttgen H, Sanger S, Fellermerier M, Eisenreich W, Zenk MH, Bacher A, Rohdich F (2000) Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2486-2490
- Hirschberg J (1998) *Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis*. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), *Carotenoids Vol.3 Biosynthesis and Metabolism*, Birkhaeuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, pp 149-194
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4: 210-218
- Hugueney P, Badililo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J* 8: 417-424
- Hugueney P, Romer S, Kuntz M, Camara B (1992) Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and zeta-carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur J Biochem* 209: 399-407
- Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK (1995) Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1679-1683
- Kumagai MH, Keller Y, Bouvier F, Clary D, Camara B (1998) Functional interaction of non-native carotenoids into chloroplasts by viral-derived expression of capsanthin-capsorubin synthase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 14: 305-315
- Kunz M, Romer S, Hugueney P, Weil JH, Schantz R, Camara B (1992) Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J* 2: 25-34
- Lange BM, Croteau R (1999a) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* 365: 170-174
- Lange BM, Croteau R (1999b) Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyses the terminal enzymatic step. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13714-13719
- Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2100-2104
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathways. *FEBS Lett* 400: 271-274
- Lois LM, Campos N, Rosa Putra S, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2105-2110
- Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gallego F, Campos N, Boronat A (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose synthase. *Plant J* 22: 503-513
- Lotan T, Hirschberg J (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -c-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett* 364: 125-128
- Luttgen H, Rohdich F, Herz S, Wungsintaweekul J, Hecht S, Schuhr CA, Fellermerier M, Sanger S, Zenk MH, Bacher A, Eisenreich W (2000) Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *E. coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1062-1067
- Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, Leon P (1996) CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J* 9: 649-658
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol* 18: 888-892
- Mann V, Pecker I, Hirschberg J (1994) Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (Pds) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol Biol* 24: 429-434
- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Hugueney P, Frey A, Marion-Poll A (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 15: 2331-2342
- Misawa N, Mazamoto K, Hori T, Ohtani T, Boger P, Sandmann G (1994) Expression of an *Erwinia* phytoene desaturase gene not only confers multiple resistance to herbicides interfering with carotenoid biosynthesis but also alters xanthophyll metabolism in transgenic plants. *Plant J* 6: 481-489
- Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K, Harashima K (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis

- of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 6704-6712
- Misawa N, Shimada H (1998) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotechnol* 59: 169-181
- Niyogi KK, Grossman AR, Bjorkman O (1998) *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121-1134
- Pfander H (1992) Carotenoids: an overview. *Meth Enzymol* 213: 3-13
- Pecker I, Chamovitz D, Linden H, Hirschberh J (1992) A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to z-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4962-4966
- Pecker I, Gaboay R, Cunningham FX Jr, Hirschberh J (1996) Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol Biol* 30: 807-819
- Ray J, Bird C, Maunders M, Grierson D, Schuch W (1987) Sequence of pTOM5, a ripening related cDNA from tomato. *Nucleic Acids Res* 15: 10587
- Ray J, Moureau P, Bird C, Bird A, Grierson D, Maunders M, Truesdale M, Bramley P, Schuch W (1992) Cloning and characterization of a gene involved in phytoene synthesis from tomato. *Plant Mol Biol* 19: 401-404
- Rodriguez-Concepcion M, Ahumada I, Diez-Juez E, Sauret-Gueto S, Lois LM, Gallego F, Carretero-Paulet L, Campos N, Boronat A (2001) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J* 27: 213-222
- Rohdich F, Eisenreich W, Wungsintaweekul J, Richtrer G, Schuhr CA, Hecht S, Zenk MH, Bacher A (2000a) Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthesis of *Arabidopsis thailana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6451-6456
- Rohdich F, Kis K, Bacher, A, Eisenreich W (2001) The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes, and intermediates. *Curr Opin Chem Biol* 5: 535-540
- Rohdich F, Wungsintaweekul J, Fellermeier M, Sagner S, Herz S, Kis K, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH (1999) Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2C-methylerythritol. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11758-11763
- Rohdich F, Wungsintaweekul J, Lutgen H, Fischer M, Eisenreich W, Schuhr CA, Fellermeier M, Schramek N, Zenk MH, Bacher A (2000b) Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-erythritol kinase from tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8251-8256
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* 295: 517-524
- Romer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Mizawa N, Schuch W, Bramley PM, Huguenev P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M (2000) Elevation of the provitamin A content of Transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol* 18: 666-669
- Romer S, Huguenev P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M (1993) Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1414-1421
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J (2000) An alternative pathway to *B*-formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11102-11107
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant delta. *Plant J* 17: 341-351
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giulano G (2000) Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* 24: 413-420
- Sandmann G (1994) Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur J Biochem* 223: 7-24
- Schledz M, Al-Babili S, von Liting J, Haudruck H, Rabbani S, Kleing H, Beyer P (1996) Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant J* 10: 781-792
- Schwender J, Muller C, Zeidler J, Lichtenthaler HK (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thailana*. *FEBS Lett* 455: 140-144
- Seo M, Koshiba T (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7: 41-48
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, De DY (1999) Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* 20: 401-412
- Spurgeon SL, Porter JW (1980) Biosynthesis of carotenoids. In: Porter JW, Spurgeon SL, (eds), *Biochemistry of Isoprenoid Compounds*, John Wiley, New York, pp 1-122
- Sun Z, Gantt E, Cunningham FX Jr (1996) Cloning and functional analysis of the beta-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 271: 24349-24352
- Takaya A, Zhang YW, Asawateratanakul K, Wititsuwannakul D, Wititsuwannakul R, Takahashi S, Koyama T (2003) Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl diphosphate synthase of *Hevea brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta* 1625: 214-220
- Veau B, Courtois M, Oudin A, Chenieux JC, Rideau M, Clastre M (2000) Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochim Biophys*

- Acta 1517: 159-163
- Walter MH, Hans J, Strack D (2002) Two distinctly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J* 31: 243-254
- Ye X, Al Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway. *Science* 287: 303-305
- Zhu XF, Suzuki K, Okada K, Tanaka K, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda K (1997a) Cloning and functional expression of a novel geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol* 38: 357-361
- Zhu XF, Suzuki K, Saito T, Okada K, Tanaka K, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M (1997b) Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. *Plant Mol Biol* 35: 331-341

(접수일자 2003년 2월 17일, 수리일자 2003년 3월 17일)