

Tropane alkaloid의 생합성과 분자육종

윤대진

경상대학교 대학원 응용생명과학부

Metabolic Engineering of Medicinal Plants for Tropane Alkaloid Production

YUN, Dae-Jin

Division of Applied Life Science (BK21 program), and Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT The tropane alkaloids hyoscyamine (its racemic form being atropine) and scopolamine are used medicinally as anticholinergic agents that act on the parasympathetic nerve system. Because they differ in their actions on the central nervous system, currently there is a 10-fold higher commercial demand for scopolamine, in the *N*-butylbromide form, than there is for hyoscyamine and atropine combined. Several solanaceous species have been used as the commercial sources of these alkaloids, but the scopolamine contents in these plants often are much lower than those of hyoscyamine. For this reason there has been long-standing interest in increasing the scopolamine contents of cultivated medicinal plants. Naturally occurring and artificial interspecific hybrids of *Duboisia* have high scopolamine contents and are cultivated as a commercial source of scopolamine in Australia and other countries. Anther culture combined with conventional interspecific hybridization also has been used to breed high scopolamine-containing plants in the genera *Datura* and *Hyoscyamus*, but without much success. The use of recombinant DNA technology for the manipulation of metabolic processes in cells promises to provide important contributions to basic science, agriculture, and medicine. In this review, I introduce on the enzymes and genes involved in tropane alkaloid biosynthesis and current progress in metabolic engineering approaches for tropane alkaloid, especially scopolamine, production.

Key words : Tropane alkaloids, metabolic engineering, biosynthetic pathway

식물이 생합성하는 유용 이차대사 산물은 고래(古來)로부터 향료, 기호품, 의약품 원료 등으로 사용되어 왔다. 식물에는 자신들의 생육을 위해 이들 이차대사산물이 필수적이지는 않지만, 이들 화합물을 생합성하는 대사경로가 잘 발달되어 있다. 현재, 구조가 알려진 이차대사산물은 저분자의 합질소 화합물인 alkaloid가 12,000종, terpenoid가 30,000종, phenylpropanoids가 2,500종, 그 외의 산물이 2,500종 등이다. 이들 중에 tropane alkaloid란 piperidine (합질소6환)과 pyrrolidine (합질소5환)이 융합된 tropane 환을 가지는 화합

물의 총칭으로서, 대표적인 것이 위장약, 경련약, 안약, 배설미약, 천식약 등으로 사용되고 있는 hyoscyamine과 scopolamine이 있으며, 담배의 nicotine, 환각제 및 진통제로 사용되는 cocaine 등도 같은 pathway를 통하여 생합성된다 (Figure 1). Tropane alkaloid는 수종(數種)의 가지과(科) 식물에서 생합성되며, 대표적인 tropane 알칼로이드 함유 수종은 *Atropa belladonna*, *Catha edulis*, *Datura candida*, *Datura innoxia*, *Datura metel*, *Duboisia myoproroides* (cork wood), *Hyoscyamus niger*, *Latua pubiflora*, *Mandragora officinarum*, *Methystichodendron amesianum*, *Scopolia carniolica* 등 가지과(科) 식물이다.

*Corresponding author Tel 055-751-6256 Fax 055-759-9363

E-mail djyun@nongae.gsnu.ac.kr

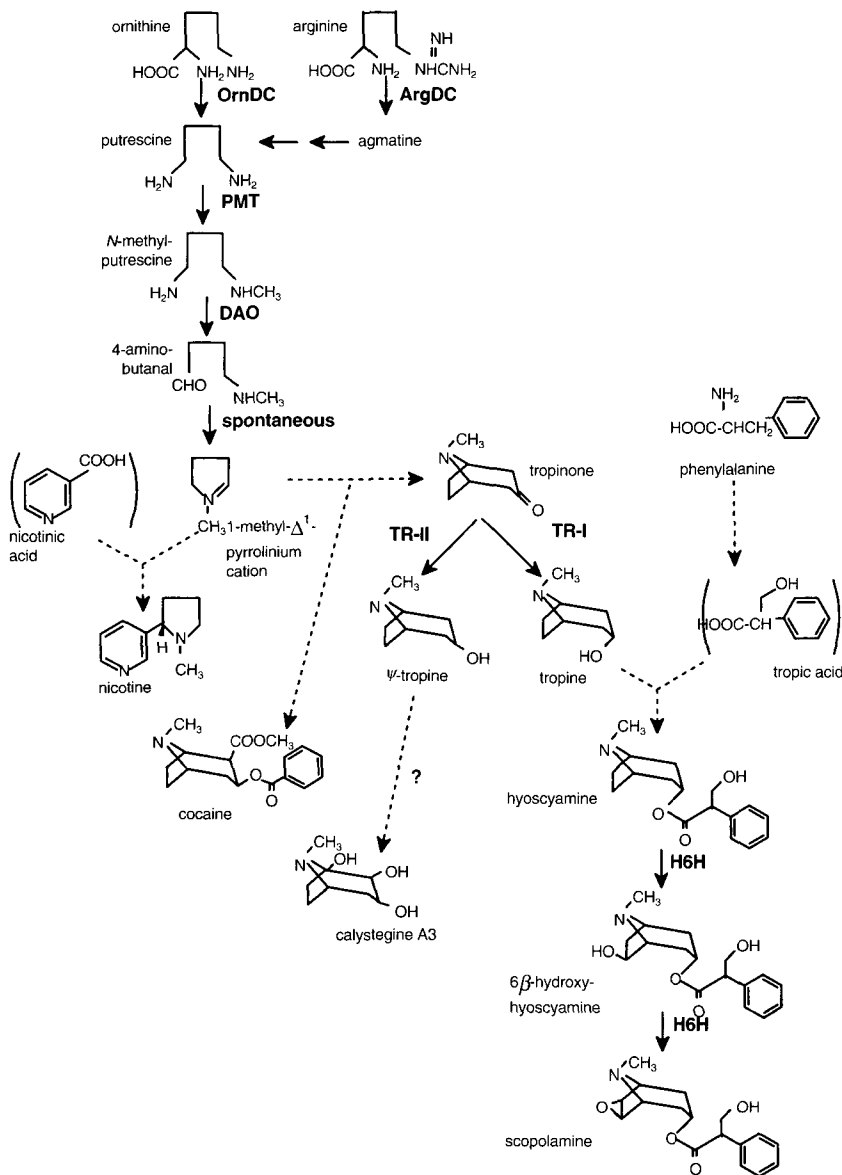


Figure 1. Biosynthetic pathways of nicotine and tropane alkaloids. ArgDC, arginine decarboxylase; OrnDC, ornithine decarboxylase; PMT, putrescine *N*-methyltransferase; DAO, diamine oxidase; TR, tropinone reductase; H6H, hyoscyamine 6β-hydroxylase.

alkaloid생산능력이 불안정하기 때문이다. 현재 tropane alkaloid 함유 식물 중 기관 배양이 널리 행해지는 식물로는 *Hyoscyamus* 속 (屬)과 *Atropa* 속 (屬)이 있으며, 이들은 배지중에 적량 (適量)의 auxin을 첨가함으로써 생육이 양호한 배양근을 배양할 수가 있다 (Hashimoto et al. 1986). 또한, *Datura* 속 (屬)은 *Agrobacterium rhizogenes* 감염에 의한 배양근의 유도가 효과적이다. 이들 배양근은 1주일에 4~6배 증가하기 때문에 통상 (通常)의 실험실에서도 1 kg의 배양근을 1개월 내에 용이하게 얻을 수가 있다.

식물배양공학을 통한 alkaloid 고생산 (高生産) 배양근 (培養根)의 확립으로 인하여 많은 연구자들이 식물 내에서 특정물질의 생합성 과정의 각 단계를 조절하는 반응 mechanism을 구체적으로 밝힐 수 있는 토대가 마련되었다. 즉, 종래의 경우 식물체 내에서 물질생산과정이나 mechanism을 연구할 경우에는, 식물 개체 또는 무세포 시스템을 재료로 하여, isotope을 이용한 추적실험 (追跡實驗)에 의한 대사경로의 추정에 머물렀으나, 고생산 (高生産) 배양세포나 배양근을 이용함으로써 인하여, 여러 가지 물질의 생합성 과정에 있어서의 반응 mechanism을 실제적으로 해명할 수 있는 유용한 방법이 처음으로 제공되게끔 되었다.

1.2 Tropane alkaloid 생합성 경로

1. 배양세포를 이용한 Tropane alkaloid 생합성 경로의 해석

1.1 세포배양의 중요성

Alkaloid 생합성의 연구, 특히 생합성 효소의 분리, 정제를 행하기 위해서는 수 (數) kg의 식물조직이 필요하다. 특히 tropane alkaloid는 한정된 가지 과 (科) 약용식물에서만 생합성될 뿐만이 아니라, 뿌리에서 생합성되는 특징을 가지고 있으므로 식물전체를 이용하여 실험재료로 쓰는 것은 용이하지 않다. 따라서 tropane alkaloid의 경우는 미분화 배양세포보다는 뿌리 조직을 이용한 기관배양이 확립되어 있다. 왜냐하면 미분화 배양세포의 경우는 세포선발과 배양은 가능하나,

Tropane alkaloid는 통상 식물체 내에서는 tropane 3위 (位)의 수산기 (水酸基)와 유기산 (有機酸)이 ester 결합한 상태로 존재한다. 이들의 생합성 경로 (Hashimoto and Yamada 1994, Figure 1)는 우선 L-ornithine은 putrescine을 경유하여 *N*-methylputrescine으로 생합성되며, 이를 촉매하는 효소가 PMT (putrescine *N*-methyltransferase)이다 (Hibi et al. 1992). *N*-methylputrescine은 diamine 산화효소 (DAO: diamine oxidase)에 의해 산화적 탈 (脫) amino된 뒤, 4-aminobutanol로 변화되고, 다음으로는 자연환원반응에 의하여 *n*-methyl-1-pyrrolidinium cation (MPC)으로 변하게 된다. Alkaloid를 생산하는 식물의 DAO는 *N*-methylputrescine에 대한 특이성이 높고, V_{max}/K_m값은 putrescine의 약 10배이다 (Hashimoto et al. 1990). 활발하게 alkaloid를 생합성하고 있

는 조직에서는 유리(遊離)N-methylputrescine의 세포 내 pool은 유리(遊離) putrescine pool의 약 5배이기 때문에 세포 내의 putrescine이 DAO의 기질이 되는 경우는 거의 없다. n-methyl-1-pyrrolidinium cation이 acetic acid와 생리조건 하에서 비효소적으로 축합하여 생긴 hygrine으로부터 생성된 tropinone은 tropinone reductase (TR)에 의하여 환원되어 tropine으로 변환된다. Tropane alkaloid를 생합성하는 식물종의 배양근에서는 3 α 부위에 수산기(水酸基)를 도입하여 tropine을 생성하는 효소(TR-I)과, 3 β 부위가 수산화되어 있는 ψ -tropine을 생산하는 효소(TR-II)의 2종류가 존재하며, 양 효소의 특이성은 크게 다르다(Hashimoto et al. 1992). *Hyoscyamus* 속(屬) 배양근은 ψ -tropine에 유래되는 alkaloid는 거의 존재하지 않음에도 불구하고 TR-II의 활성이 TR-I보다 강하지만, 이 효소가 alkaloid 생합성에 미치는 역할에 관해서는 아직 알려져 있지 않다. Tropine은 phenylalanine에서 유래하는 L-tropic acid와 ester 결합하여 hyoscyamine으로 생합성되지만 여기에 해당하는 효소는 아직 밝혀져 있지 않다.

Hyoscyamine에서 scopolamine으로의 변환은 우선 tropic acid ring의 6 β 부위가 hydroxylation되고, 6 β -hydroxyhyoscyamine의 7 β 부위의 수소가 이탈됨으로써 epoxidation에 의한 bridge가 형성된다(Hashimoto and Yamada 1989). 종래에는 6,7-dehydrohyoscyamine을 식물체에 투여하면 scopolamine으로 변환되는 결과로부터 6,7-dehydrohyoscyamine이 scopolamine의 전구체라고 생각되었다. 그러나 최근에 6 β 위의 수산기의 산소를 ^{18}O 로서 표식한 6 β -hydroxyhyoscyamine을 배양세포에 투입하면, scopolamine의 epoxidation에 관여하는 산소는 ^{18}O 로서 표식되는 것이 밝혀졌다. 즉, 6,7-dehydrohyoscyamine으로부터 scopolamine으로의 변환은, hyoscyamine을 hydroxylation하는 효소가 통상의 hydroxylation반응과 함께 epoxidation 반응을 동시에 촉매하는 것으로 보이는 일종의 artifact이다. 또한 이것을 입증하는 결과로서 식물체에서는 6,7-dehydrohyoscyamine이 검출되어 있지 않다.

2. Tropane alkaloid의 생합성효소와 유전자들

2.1 Putrescine N-methyltransferase (PMT)

PMT (EC2.1.1.53)는 tropane alkaloid와 nicotine 생합성에 공통적으로 작용하는 효소로서, S-adenosylmethionine (SAM) 의존적으로 putrescine에 methyl기를 전위시켜 N-methylputrescine을 생성시키는 효소로서 nicotine과 tropane alkaloid 생합성에 관여한다(Figure 1). PMT는 tropane alkaloid뿐만 아니라 nicotine 생합성에 있어서 중요한 rate limiting 효소이기 때문에 PMT를 순수 분리한 다음, amino

acid를 분석하고, 분석한 amino acid로부터 cDNA를 유추하여 cloning 하고자하는 시도가 활발하게 진행되었다. 그러나 이 효소는 매우 불안정하기 때문에 분리정제를 통한 PMT유전자의 확보가 매우 어려웠다. 최근, Hibi 등은 nicotine 생합성 돌연변이체에 주목하여, differential screening법을 행하고, 그 결과 PMT유전자를 clone하게 되었다(Hibi et al. 1994).

Cuba 시거담배(Cuban cigar tobacco)로 사용되는 LA Burley 21 중에는 parental burley 21 품종과 개화시기, 잎의 수, 식물의 신장 등은 비슷하지만, nicotine 함량이 낮기 때문에 곤충의 피해에 민감한 돌연변이체가 존재한다. 유전학적인 분석의 결과에 의하면 이 품종의 nicotine 생합성의 이상(異常)은 두 개의 semi-dominant 유전자인 A와 B에 의하여 조절된다. 이들 두 유전자는 부가적인 효과(additive effect)를 가지고 있으며, A locus는 B locus보다 2.4배 강한 효과를 보인다. 또한, nicotine 생합성에 관여하는 효소인 PMT의 활성은 이들 돌연변이체에서 감소되는 경향을 보인다. 이러한 현상에 착목하여, Hibi 등은 이들 돌연변이체와 야생형의 식물체를 사용하여, differential screening을 행하였고 그 결과 2개의 cDNA clone을 확보하였다. 그중 한 유전자를 대장균에 발현시켜 단백질을 정제한 다음, PMT 활성을 검사해본 결과 PMT 활성을 가지는 것을 확인할 수가 있었다. 또한 이 clone의 발현은 뿌리 조직 특이적이며, LA Burley 21 품종에서 그 발현이 현저히 줄어들음을 확인할 수가 있었다(Hibi et al. 1994).

PMT의 발현조절에 관한 연구는 nicotine 생합성 식물인 *Nicotiana glauca*와 tropane alkaloid 생합성 식물인 *Atropa belladonna*를 중심으로 수행되었다. Suzuki (1999) 등에 의하면, *Atropa belladonna*에서 분리한 PMT (AbPMT1)에 GUS report유전자를 연결하여 도입한 결과 뿌리의 pericycle세포에 특이적으로 발현되며, 5'의 300 bp upstream region이 이들 발현에 충분히 역할을 함을 알 수가 있었다. 또한 PMT유전자는 흥미롭게도 식물호르몬인 methyljasmonate에 의하여 발현이 유도됨을 알 수가 있었으며, ethylene은 nicotine 생합성에서의 methyljasmonate의 역할을 길항(antagonize)함을 알 수가 있었다(Shoji et al. 2000).

Nicotine은 *Nicotiana*종이 식물에서 생합성되는 alkaloid 중 가장 주된 alkaloid이며, 체식동물의 신경계에 작용하여 독성을 가지는 일종의 방어기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이러한 nicotine의 생체방어 물질로서의 기능은, nicotine의 함량이 곤충이나 상해등에 의하여 식물체가 상처를 입었을 때 앞에서 대량으로 축적된다는 보고에 기인한다. Nicotine은 뿌리에서 생합성되어 도관(xylem)을 타고 지상부로 전류(translocation)된다. 따라서, 조직의 상해는 앞에서 인식되며 상해 신호(signal)는 뿌리로 전달되어 뿌리에서 nicotine 생합성이 활성화되는 것으로 추정된다. 이러한 상해 신호의 한 후보자는 methyljasmonate이다. 식물의 잎이 상해를 당한 약

2시간 뒤 *Nicotiana glauca*의 뿌리에서 endogenous methyljasmonate의 농도가 증가한다. 또한 jasmonate의 생합성에 관여하는 octadecanoid pathway의 inhibitor를 처리함으로써 jasmonate의 생합성을 저해시키면, 상해처리에 의하여 증가되는 nicotine의 생합성이 저해된다. 또한 역으로, 외부에서 jasmonate를 *Nicotiana glauca*의 잎에 처리하면, nicotine의 생합성이 증가된다. 따라서 methyljasmonate는 상해에 의한 nicotine 생합성의 신호전달 물질일 가능성이 높은 것으로 생각된다.

2.2 Diamine oxidase (DAO)

DAO는 생물계에 널리 존재하는 효소로서, 식물에서는 콩과 식물체에서 특히 강한 활성을 보이지만 그 생리적인 의미는 분명하지 않다. Alkaloid 생합성에 관여하는 DAO는, 다른 생물의 DAO와 똑같이 구리이온 킬레이트나 carbonyl시약에 의하여 활성이 저해되기 때문에, 활성부위에 구리이온과 pyrrolo-quinoline quinone (PQQ)을 가진다고 추정된다. 그런데 반하여 기질의 특이성은 다른 DAO와 크게 달라, 대칭형 diamine보다도 methylputrescine을 특히 좋은 기질로 사용하며, methylputrescine의 V_{max}/K_m 값은 putrescine보다도 약 10배 정도 크다 (Hashimoto et al. 1990). Alkaloid 생합성이 왕성한 배양근(培養根)에서는 methylputrescine의 세포 내 pool은 putrescine보다 5배 크기 때문에 세포 내에서는 putrescine의 약 50배 양의 methylputrescine이 산화된다. 즉, putrescine은 DAO에 의해 산화되기 전에 활성이 강한 PMT에 의해 methylputrescine으로 변환되어, 정상적인 alkaloid 생합성이 진행되는 것으로 추정된다.

2.3 Tropinone reductase (TR)

Tropane alkaloid의 생합성 경로에 있어서, 아주 중요한 분기점은 tropinone을 tropine이나 pseudotropine (ψ -tropine)로 변환시키는 경로이다 (Figure 1). 이들 화합물들은 각각 그들의 3-hydroxyl group에 서로 반대의 입체화합구조를 가진 서로 다른 alkaloid 화합물들로 유입되어 간다. TR-I (EC1.1.1.206)은 tropinone의 3-carbonyl group을 tropine의 3 α -hydroxy group으로 환원시킨다. 반면에 TR-II (EC1.1.1.236)는 tropinone의 3-carbonyl group을 ψ -tropine의 3 β -hydroxy group으로 환원시킨다. 현재까지 조사한 모든 tropane alkaloid를 생합성하는 식물체는 비록 그 활성의 정도는 다르다고 할지라도 TR-I과 TR-II의 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Hashimoto et al. 1992). Tropine과 ψ -tropine (3 β -hydroxytropine)은 생체 내에서 서로 전환되지 않고, 각각 다른 종류의 alkaloid로 변환되어 가기 때문에 이들의 세포 내의 존재 여부와 두 TR효소의 활성 정도가 alkaloid 생합성 경로에 있어서의 분기점 (branching point)을

결정짓는 중요한 요소이다. 최근 Nakajima 등은 이들 두 효소의 유전자를 *Datura stramonium*에서 분리하였다 (Nakajima et al. 1993).

TR-I과 TR-II의 cDNA는 각각 273개와 260개의 amino acid를 code하고 있으며, 이들 유전자들을 대장균에 발현하여 효소활성을 측정하면 식물체에서 분리한 native TR들과 마찬가지로 TR특이적인 반응을 촉매하였다. 이들 cDNA로부터 유추한 amino acid의 sequence는 260개의 amino acid를 비교하면 약 64%의 상동성을 보이고, short chain의 nonmetal dehydrogenase와 상당한 유사성을 보였다. 이와 같은 결과는 두 TR이 서로 공통된 선조를 가지고 있음을 시사한다. 또한 Southern blotting 결과, 이들 유전자들은 tropane alkaloid를 생합성하는 식물에서만 특이적으로 검출되었으며, 다른 식물종에서는 검출되지 않았다. 정량적인 reporter assay와 nuclear run on assay를 통한 실험의 결과 두 TR은 비록 서로 다른 활성을 가지고 있지만, 두 TR 모두 비슷한 속도로 전사 (transcribe)되어짐을 알 수가 있었다. 두 TR에 관한 가장 흥미있는 의문사항은 두 단백질의 어떤 구조가 두 효소의 특이성을 결정하는가이다. Domain swapping을 통한 연구결과에 의하면 C-terminal의 120개 amino acid가 substrate binding에 중요하며, TR단백질들의 기질 특이성은 그들의 입체구조의 특이성에 기인하는 것으로 밝혀졌다 (Nakajima et al. 1994). TR-I과 TR-II를 비교하면, C-terminal의 120개 amino acid 중 53개가 서로 다르다. Nakajima 등은 *Datura stramonium*으로부터 분리한 TR-I과 TR-II의 결정화에 성공하고, 이 결과를 보고하였다 (Nakajima et al. 1998). 이들 결정은 TR-I이 2.4 Å, TR-II가 2.3 Å의 resolution을 가졌다. 분석결과 두 단백질의 전체적인 구조는 매우 비슷하였다. 또한 cofactor가 결합하는 부분과 활성부위도 두 TR 모두 상당히 비슷하였다. 그러나 비록 두 단백질 모두 기질이 결합하는 부위가 비슷하다고 할지라도 두 단백질을 구성하고 있는 hydrophobic한 amino acid의 서로 다른 charge가 두 단백질의 정전기적인 환경의 차이를 야기하는 것으로 추측되며, tropinone의 결합방향을 결정하며, 그들 반응산물의 입체구조 특이성을 결정할 것으로 생각되었다. 이를 뒷받침하는 결과로서 site-directed mutagenesis법을 통한 실험에서 두 단백질의 기질결합부위의 5개의 amino acid의 교체는 기질의 특이성을 바꿈을 알 수가 있었다 (Nakajima et al. 1999). 따라서, 두 TR 단백질은 기질결합부위의 몇 개의 amino acid의 차이에 의하여 입체구조의 특이성이 결정됨을 알 수가 있었다.

TR발현해석은 각각의 TR에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 분석되었다 (Nakajima and Hashimoto 1999). *Hyoscyamus niger* 식물의 경우 두 TR은 모두 뿌리의 측근 (lateral root)에서 높게 축적되며, 측근의 발달과정 동안에 증가된다. 배양근의 경우는 root apex가 아닌 basal region에 높게 축적된다. 이러한 발현 양상은 같은 tropane alkaloid 생합성 경로 downstream에 존재하는 H6H와 유사한 발현 pattern

이다. 그러나 면역조직화학적 분석 (immunohisto chemical analysis)의 결과는 배양세포 내에서 H6H와 TR은 서로 다른 세포에서 발현됨을 알 수가 있었다. 이와 같은 결과는 alkaloid 생합성의 중간산물들이 서로 다른 세포층을 통하여 이동하여 효소반응의 기질로 작용함을 시사한다.

2.4 Hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H)

H6H (EC1.14.11.11)는 hyoscyamine에서 6 β -hydroxyhyoscyamine을 경유하여 scopolamine을 생합성하는 데 필요한 hydroxylation과 epoxidation의 2단계의 반응을 촉매하는 bi-functional한 효소이다 (Hashimoto et al. 1993, Figure 1). Scopolamine은 *Hyoscyamus niger*, *Duboisia myoporoides*, *Datura sanguinea* 등 과지와 식물에서 축적되는 alkaloid로서 hyoscyamine의 tropane골격의 6,7위가 epoxidation되어 생성된다. H6H는 2-oxoglutarate 의존형 dioxygenase family에 속하며, 반응에 2-oxoglutarate, Fe²⁺, ascorbic acid 및 O₂를 필요로 한다. 2-Oxoglutarate는 반응과 동반하여 succinic acid와 CO₂로 산화적으로 분해된다. 이 분해 반응 중에 탈 탄소의 속도와 hyoscyamine의 hydroxylation 속도를 측정해 보면 거의 비슷한 값을 얻을 수가 있다. H6H는 *Hyoscyamus niger* 배양근으로부터 비교적 간단히 균일 단백질로 정제가 가능하다 (Yamada et al. 1990). 고도로 순수 정제한 H6H를 이용하여 alkaloid기질에 대한 특이성을 조사해 보면, H6H는 hyoscyamine과 비슷한 구조를 가진 화합물들을 hydroxylation시킨다 (Yamada and Hashimoto 1989).

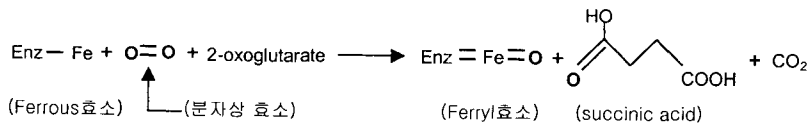
H6H는 hydroxylation의 약 2%에 불과하지만 6 β -hydroxyhyoscyamine을 scopolamine으로 epoxidation시키는 반응도 촉매한다 (Hashimoto et al. 1989). 이반응에 있어서 6 β -hydroxyhyoscyamine의 7 β 에 있는 수소는 떨어져 나가고 6 β hydroxyl기는 보존되며, 이러한 탈 수소반응에 의한 epoxidation bridge의 형성은 식물체에 있어서 scopolamine의 생합성의 필수요건이 된다. 따라서 H6H는 한종류의 hydroxylation과 2종류의 epoxidation이라고 하는 총 3종류의 산화반응을 촉매한다. 다른 2-oxoglutarate 의존형 효소 (특히 동물의 prolyl hydroxylase)를 참고로 하여 H6H의 반응 mechanism를 추정해 보면 (Figure 2), 제1단계로 우선 Fe²⁺을 함유하는 효소 (ferrous enzyme:enz=Fe)가 분자상 산소에 의하여 산화되어 ferryl enzyme(Enz=Fe=O)로 생성되고 동시에, 2-oxoglutarate가 산화적으로 탈(脫) 탄산(炭酸)되어 succinic acid가 생성된다 (Figure 2). 그림의 제2단계에 나타낸 산화반응은 hyoscyamine이 기질일 경우, H6H는 C6-H β 결합을 절단하고 ferryl 산소를 삽입한 결과 6 β 부위가 hydroxylation된다 (Figure 2의 경로 A). 6 β -hydroxyhyoscyamine과 같이 6 β 부위가 hydroxyl기 등으로 blocking되어 있는 경우, 대신에 C7-H β 결합이 저 빈도로 절단되어, 생성한 탄소 radical은 6 β hydroxyl기의 공격을 받음

에 의하여 epoxidation이 일어난다 (경로 C). Epoxidation bridge 형성의 다른 경로는 6,7-dehydroxyhyoscyamine의 6,7-2중결합에 직접적으로 ferryl 산소가 삽입되는 경로가 있으며, 이 경우도 scopolamine이 생성된다 (경로 B).

보통의 식물체에서는 6 β -hydroxyhyoscyamine의 축적이 거의 일어나지 않고 scopolamine이 축적된다. 이와 같은 결과는 위에서 기술한 H6H의 반응특이성 만으로는 설명이 곤란하다. 즉, H6H의 epoxidation 활성 (경로 C)이 hydroxylation (경로A)보다도 훨씬 약하다고 한다면, 식물체 중에는 6 β -hydroxyhyoscyamine이 대량으로 축적되어야 하나 사실은 그렇지 않다. 식물체에서의 H6H의 역할을 조사하기 위하여 저자는 H6H를 가지고 있지 않는 식물체인 담배에 H6H의 cDNA를 CaMV35 promoter의 하류에 연결하고 도입하였다. H6H를 대량으로 발현하고 있는 형질 전환 식물체에 hyoscyamine과 6 β -hydroxyhyoscyamine을 feeding한 결과 두 화합물 모두 효율 좋게 scopolamine으로 전환됨을 알 수가 있었다 (Yun et al. 1993). 이와 같은 결과로 왜 in vivo와 in vitro에서 H6H의 반응성이 다른가에 대한 것은 불분명하기는 하지만 중요한 사실은 H6H가 hyoscyamine으로부터 scopolamine에 이르는 반응 경로의 rate limiting 효소임에 틀림이 없다는 것을 의미한다.

Matsuda 등 (1991)은 *Hyoscyamus niger*의 배양근으로부터 균일하게 정제한 H6H 효소를 endopeptidase로 부분 분해한 뒤 얻은 내부 peptide의 amino acid의 정보를 바탕으로 하여 합성한 oligonucleotide를 probe로 사용하여 *hyoscyamus niger* 배양근 mRNA 유래 cDNA library를 screening하여, H6H cDNA를 cloning 하였다. cDNA 염기배열로부터 예상되는 H6H의 분자량은 약 38,999Da로서 예상 분자량 41kDa와 비슷함으로써 H6H는 monomer로서 그 효소활성을 가짐을 알 수가 있었다. 이렇게 확보된 H6H cDNA로부터 유추되는 amino acid를 바탕으로 단백질 Data base를 검색한 결과 3가지 group의 단백질과 유사성이 있었다 (Matsuda et al. 1991). 제1 group은 2-oxoglutarate 의존형 단백질로 분류되는 group으로서 방선균(放線菌)이나 곰팡이가 생산하는 항생 물질인 cephalosporin의 생합성 효소인 deacetyl cephalosporin C 합성 효소 (DACS)와 deacetoxy cephalosporin C 합성 효소(DAOCS)가 그 member였다. 곰팡이에서는 단일의 bi-functional 효소가 DACS 활성과 DAOCS 활성을 다 가지고 있다. 방선균에서는 각각의 효소에 의하여 촉매된다. 두 번째 group은 2-oxoglutarate 의존형 이외의 효소로서 isopenicillin N 합성 효소 (IPNS)로서, H6H는 이 효소와 상동성을 가졌다. IPNS도 반응에 Fe²⁺와 ascorbic acid를 필요로 하지만 2-oxoglutarate는 필요로 하지 않는다. IPNS의 경우도 H6H와 마찬가지로 활성형 효소로서 ferryl 효소 중간체가 추정되며, 이 반응 mechanism의 유사성이 1차 구조의 유사성에 반영되어 있다고 생각된다. 제3 group은 1차 구조와 그 촉매 반응은 추정되어 있지만 in vitro에서의 효소활성이 측정되어

Step 1



Step 2

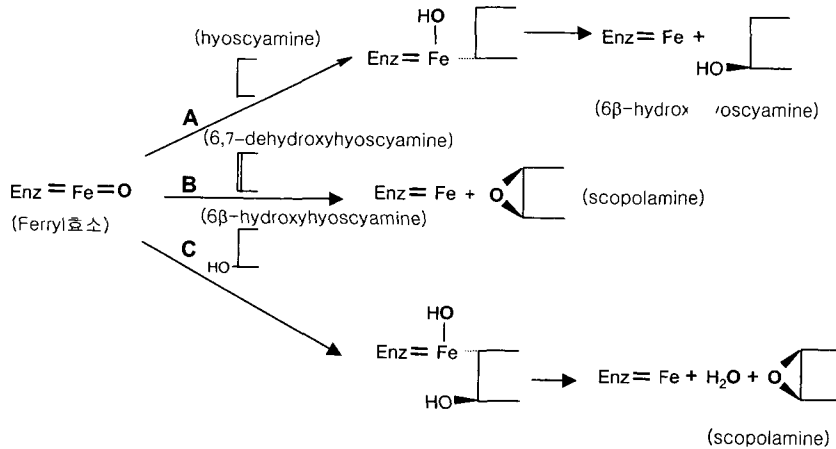


Figure 2. Proposed reaction mechanism of hyoscyamine 6β-hydroxylase. It consist of two steps: Step 1, the reaction with ferrous enzyme, dioxygen and 2-oxoglutarate produce ferryl enzyme, succinate and CO₂. The oxygen derived from dioxygen is represented by bold letters. Step 2, the ferryl enzyme hydroxylates hyoscyamine. See text for detail.

있지 않는 단백질로서 식물 유래의 2종류의 단백질이다. 그 중 하나는 최근 antisense 실험으로부터 aminocyclopropane 1 carboxyl acid로부터 ethylene을 생성하는 반응에 관여한다고 추정되는 ethylene forming enzyme (EFE)이었다. 또 다른 하나는 옥수수의 A2 유전자좌에 존재하는 flavanone 3β-hydroxylase (F3H)이다. 현재까지 EFE와 F3H의 활성이 in vitro에서 측정된 보고가 없다. 아마도 그 원인은 이들 산화효소의 반응에는 2-oxoglutarate, Fe²⁺와 ascorbic acid를 필요로 하기 때문일 가능성이 충분히 존재한다.

Tropane alkaloid의 생합성은 다른 많은 이차대사와 마찬가지로 조직특이적으로 발현한다. 식물체에 있어서 생합성 부위의 결정은 과거에 alkaloid를 생합성하는 가지과 식물과 생합성하지 않는 가지과 식물의 지상부와 지하부를 접목을 통하여 서로 교환하고, 각 부위의 alkaloid 함량을 측정함으로써 알 수가 있었다. 최근에는 지상부와 지하부를 각각의 실험관 내에서 배양하여 생합성 부위를 결정하게 되었다. 생합성 효소가 발견되어 있는 경우는 각 조직별로 효소활성을 측정할 수가 있다. H6H의 경우는 항체를 이용한 면역조직화학적 실험과 분자생물학적인 실험에 의하여 alkaloid의 생합성 조직 및 세포 특이적인 발현 조직을 알 수가 있었다. 또한, H6H cDNA를 probe로 사용하여 northern blotting을 행하면 H6H mRNA는 식물체의 뿌리와 배양조직에는 존재하지만, 잎, 줄기, 배양세포에는 검출되지 않는다. 흥미있는 것은 천연의 식

물 뿌리보다도 배양근의 경우가 훨씬 많은 양의 발현이 검출된다. H6H항체를 이용한 면역조직화학적 실험의 결과 H6H단백질은 뿌리의 pericycle세포 특이적으로 발현된다 (Hashimoto et al, 1991, Figure 3). 이러한 결과로부터, tropane alkaloid는 뿌리에서 생합성된 다음 도관을 타고 전류 (translocation) 되어 잎에서 축적될 것으로 생각된다.

3. 분자유종

유용 물질 추출을 위해서는 막대한 양의 biomass가 필요로 하지만, 생물 종의 급격한 감소 때문에 자연계로부터 biomass를 수급하기가 곤란하다. 식물의 유용물질은 식물체 내에 소량 존재하는 경우가 대부분이고, 질병이나 가뭄 등의 환경적인 영향을 많이 받는다. 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위해 많은 연구가 있어왔는데 그 노력의 대표적인 사례가 식물 세포 및 조직배양에 의한 유용물질 생산이다. 즉, 기내배

양기술은 환경의 영향을 받지 않고, 완벽한 control 하에 시장 수요에 따라 원하는 양을 언제든지 생산할 수 있는 이점이 있다.

조직배양 기술의 발달로 인하여 여러 식물체로부터 배양근을 유도하여, alkaloid를 생산하고자 하는 시도가 왕성이 이루어 졌다. 그러나 기내배양기술의 급격한 발전에도 불구하고 실용화된 예는 많지 않다. 그 이유는 불균일한 생산성, 모식물체보다 낮은 생산성, 그리고 대량배양기술의 미흡이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 고생산성 세포주 선발, 물질 생합성 조건 최적화 등이 많은 연구자들에 의해 개발되어 왔으나 아직까지 기대에 부합하지 못하고 있다. 따라서, 조직배양에만 의존한 물질의 생산을 극복할 수 있는 한 수단으로서 대사 제어공학을 통한 물질 생산이 필요로 한다. 식물생물공학 관련 학자들에 의하면 대상물질의 단가가 kg 당 \$2,000에 달해야 세포배양기법이 경제성이 있다고 보고하였지만, 최근 고생산성 세포선별 및 고농도 배양기술 (70 g dry cell biomass/L)이 성공함에 따라 목표화합물의 경제적 상한선이 \$100 이하로 내려가고 있는 실정이다. Tropane alkaloid계 물질은 kg 당 단가가 \$1,300~2,000 정도이나 국내 및 해외에서 거대한 시장을 가지고 있다. 대사공학적으로 확립된 세포주는 물질 생합성능이 안정적이고 수율이 높을 것이다. 여기에 다양한 배양기법을 통해 생산법을 구명하고, 공정을 확립한다면 보다 효율적으로 경제성을 확보할 수 있을 것이다.

대사제어공학을 위해서는 선행되어야 할 연구를 열거하면 다음과 같다.

3.1 생합성 경로 해석의 필요성

생합성 경로의 해석과 그 조절에 대한 이해는 유용물질을 대량 생산하고, 산업화하는 데 있어서 가장 중요한 요소이다. Alkaloid를 비롯한 식물유래 이차대사 산물 생합성 경로의 큰 특징은 대사산물이 동일 화합물이라 할지라도 식물종이 다르면, 그 생합성 경로가 다르다는 것이다. 즉, Figure 4에서 보는 바와 같이 중간대사 산물인 D의 생합성에도 C를 경유하는 생합성계와 B를 경유하는 생합성계가 있다. 따라서 유전자 공학적 수법에 의하여 외부유전자를 도입할 경우, 도입하고자 하는 식물이 어떠한 경로로 목적화합물을 생합성하는지를 반드시 알아야하며, 거기에 부합하는 유전자를 도입하는 것이 대사제어공학에 필수적인 항목이다.

3.2 활성이 강한 몰속효소 (律速酵素; rate-limiting enzyme) 확보의 필요성

약용 이차대사산물의 생합성 경로에는 무수히 많은 반응효소가 존재한다. 그러나, 이들 중 최종산물의 생성에 영향을 주는 효소는 몇몇의 중요한 key enzyme이다. 따라서 유용약용성분을 대량 생산하는 고부가가치 형질전환 식물체를 개발하기 위해서는 rate-limiting enzyme의 동정이 필수적이다. 한편 같은 rate-limiting enzyme이라고 하더라도 alkaloid 생합성 식물의 종류에 따라서 그 효소활성이 다르며, 생합성 양도 다름을 알 수가 있다. 예를 들면 *Atropa belladonna* 식물은 hyoscyamine에서 scopolamine까지의 반응을 촉매하는 효소인 hyoscyamine 6 β -hydroxylase의 활성이 *H. niger*보다 약하다. 따라서 여러 식물체로부터 각 생합성 효소 단백질들을 분리하여 각각의 발현량 및 활성과 생합성되어 나오는 alkaloid의 함량을 조사하게 되면, 보다 더 생합성 활성이 강한 rate-limiting enzyme을 얻을 수가 있을 것이다.

3.3 Tropane alkaloid의 대사제어공학

Tropane alkaloid 중에서 hyoscyamine과 scopolamine은 위장약, 경련약, 안약, 배설미약, 천식약 등으로 사용되고 있는 중요한 약용물질이다. 이들 두 화합물은 유사한 구조를 가진 화합물로서 두 화합물 모두 자율신경 (自律神經)이 지배 (支配)하는 장기 (臟器)에 광범위한 약리 작용을 가지고 있다. 하지만, hyoscyamine은 중추신경을 흥분시키는 부작용을 가지고 있는데 대해 scopolamine은 중추신경을 진정시키는 작용을 가지고 있다. 따라서 hyoscyamine보다는 scopolamine에 대한 수요가 훨씬 높다. 그러나 tropane alkaloid를 생합성하는 대부분의 가지 과 (科) 식물들은 불행히도 scopolamine보

다는 hyoscyamine을 main alkaloid로서 축적하기 때문에 scopolamine에 대한 수요가 hyoscyamine보다 훨씬 높다. 저자 등은 H6H가 hyoscyamine에서 scopolamine에 이르는 경로의 rate limiting 효소임을 밝히고, H6H를 hyoscyamine을 main alkaloid로 생합성하는 *Atropa belladonna* 식물에 도입함으로써 *Atropa belladonna* 식물의 alkaloid 조성을 hyoscyamine type에서 scopolamine type으로 개량하는 데 성공하였다 (Yun et al, 1992).

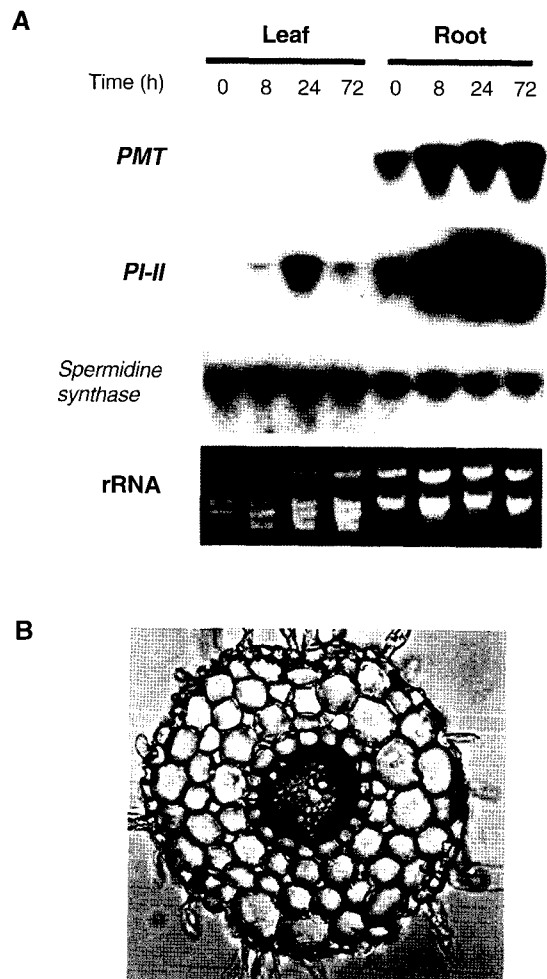


Figure 3. Tissue specific expression PMT and H6H. A, RNA gel blot analysis of tobacco plants treated with methyl jasmonate. Total RNA was prepared from leaves and roots of tobacco plantlets treated with methyl jasmonate vapor for 0, 8, 24, 72 h. RNA gel blots were probed with tobacco PMT, proteinase inhibitor-II (PI-II), and spermidine synthase genes; B, Immunohistochemical analyses of root cross sections prepared from *H. niger* cultured roots with a nascent lateral root primordia. Antibodies used was anti-H6H. H6H protein is accumulated in the pericyclic cells.

4. 결론 및 전망

현재 식물생명공학 산업의 흐름을 보면, 2010년쯤부터는 형질전환 식물체로부터 유용물질이 생산되어 산업적으로 이용되어 질 것으로 생각된다. 하지만, 식물이 생합성하는 유용 이차대사산물은 거미줄처럼 복잡하게 얽혀 있는 경로를 통하여 생합성되기 때문에 이차대사산물의 생합성의 전체 지도를 그리 것은 아직까지도 요원하며, 현재까지 유용 생합성 유전자들의 확보는 전 세계적으로 초보 단계에 있다.

Tropane alkaloid는 가지 과 (科) 식물에서만 생합성이 일어나며, 생합성에 관련된 유전자들은 대부분 뿌리의 pericycle 에만 존재 할 뿐만이 아니라, PMT 등은 methyl jasmonate 등과 같은 elicitor에 의하여 그 발현이 대량으로 유도되는 특징을 가지고 있다. 따라서 최근에는 differential screening, EST, DNA chip 기술을 사용하여, pericycle 특이적으로 발현됨과 동시에 methyl jasmonate 등과 같은 elicitor에 의하여 발현이 유도되는 유전자들을 대량으로 분리하고자 하는 시도가 활발히 진행되고 있다. 그러나 이러한 유전체 연구가 성공적으로 진행되기 위해서는 이러한 연구를 통하여 대량으로 확보한 유전자의 기능을 검증할 수 있는 연구시스템의 확립이 무엇보다도 중요하다. 따라서, 궁극적으로 세계 10대 의약품에 속하는 tropane alkaloid의 안정적인 생산이 가능하기 위해서는 이러한 유전체 연구와 더불어 종래에 행하여온 배양공학, 대사제어공학 및 feeding 실험을 통한 대사경로의 규명 등의 종합적인 연구가 체계적으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

사사 - 본 논문은 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물 이용기술개발사업단(과제번호PF003103-00)에 의해 지원되었음.

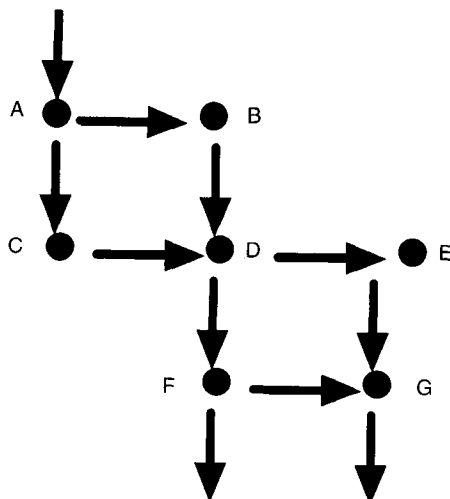


Figure 4. Metabolic Grid. See text for detail.

인용문헌

- Hashimoto T, Yamada Y (1989) Biosynthesis of scopolamine from [7-²H] 6 β -hydroxyhyoscyamine in *Duboisia* shoot cultures. *Agric Biol Chem* **53**:863-864
- Hashimoto T, Yamada Y (1994) Alkaloid biogenesis: Molecular aspects. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**:257-85
- Hashimoto T, Yukimune Y, Yamada Y (1986) Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *J Plant Physiol* **124**:61-75
- Hashimoto T, Kohno J, Yamada Y (1989) 6 β -hydroxyhyoscyamine epoxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Phytochemistry* **28**:1077-1082
- Hashimoto T, Mitani A, Yamada Y (1990) Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. Its function in tropane alkaloid biosynthesis. *Plant Physiol* **93**:216-221
- Hashimoto T, Hayashi A, Amano Y, Kohno J, Iwanari S, Yamada Y (1991) Hyoscyamine 6 β -hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *J Biol Chem* **266**:4648-4653
- Hashimoto T, Nakajima K, Ongena G, Yamada Y (1992) Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiol* **100**:836-845
- Hashimoto T, Matsuda J., Yamada Y (1993) Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 β -hydroxylase. *FEBS Lett* **329**:35-39
- Hibi N, Fujita T, Hatano M, Hashimoto T, Yamada Y (1992) Putrescine N-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. *Plant Physiol* **100**:826-835
- Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T, Yamada Y (1994) Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant cell* **6**:723-735
- Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T, Yamada Y (1991) Molecular cloning of hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J Biol Chem* **266**:9460-9464
- Nakajima K, Hashimoto T (1999) Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant cell Physiol* **40**:1099-1107
- Nakajima K, Hashimoto T, Yamada Y (1993) Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:9591-9595
- Nakajima K, Hashimoto T, Yamada Y (1994) Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites. *J. Biol.Chem.* **269**:11695-11698
- Nakajima K, Yamada Y, Akama H, Nakatsu T, Kato H, Hashimoto T, Oda JI, Yamada Y (1998) Crystal structures of two tropinone reductases: Different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:4876-4881

- Nakajima K, Kato H, Oda JI, Yamada Y, Hashimoto T** (1999) Site-directed mutagenesis of putative substrate-binding residues reveals a mechanism controlling the different stereospecificities of two tropinone reductases. *J Biol Chem* **274**:16563-16568
- Shoji T, Nakajima K, Hashimoto T** (2000) Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **41**:1072-1076
- Suzuki KI, Yamada Y, Hashimoto T** (1999) Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiol* **40**:289-297
- Yamada Y, Hashimoto T** (1989) Substrate specificity of hyoscyamine 6 β -hydroxylase from cultured root of *Hyoscyamus niger*. *Proc Jpn Acad Sci Ser B* **65**:156-159
- Yamada Y, Okabe Y, Hashimoto T** (1990) Homogeneous hyoscyamine 6 β -hydroxylase from cultured root of *Hyoscyamus niger*. *Proc Jpn Acad Sci Ser B* **66**:73-76
- Yun DJ, Hashimoto T, Yamada Y** (1992) Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:11799-11803
- Yun DJ, Hashimoto T, Yamada Y** (1993) Transgenic tobacco plants with two consecutive oxidation reactions catalyzed by hyoscyamine 6 β -hydroxylase. *Biosci Biotech Biochem* **57**:502-503

(접수일자 2002년 4월 26일)