

Flavonoid 생합성: 생화학과 대사공학적 응용

박종석* · 김종범 · 김경환 · 하선화 · 한범수 · 김용환

농업생명공학연구원 신기능소재개발과

Flavonoid Biosynthesis: Biochemistry and Metabolic Engineering

PARK, Jong-Sug* · KIM, Jong-Bum · KIM, Kyung-Hwan · HA, Sun-Hwa · HAN, Bum-Soo · KIM, Yong-Hwan

Metabolic Engineering Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA,

Seodun-Dong, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT Flavonoid biosynthesis is one of the most extensively studied areas in the secondary metabolism. Due to the study of flavonoid metabolism in diverse plant system, the pathways become the best characterized secondary metabolites and can be excellent targets for metabolic engineering. These flavonoid-derived secondary metabolites have been considerably divergent functional roles: floral pigment, anticancer, antiviral, antitoxin, and hepatoprotective. Three species have been significant for elucidating the flavonoid metabolism and isolating the genes controlling the flavonoid genes: maize (*Zea mays*), snapdragon (*Antirrhinum majus*) and petunia (*Petunia hybrida*). Recently, many genes involved in biosynthesis of flavonoid have been isolated and characterized using mutation and recombinant DNA technologies including transposon tagging and T-DNA tagging which are novel approaches for the discovery of uncharacterized genes. Metabolic engineering of flavonoid biosynthesis was approached by sense or antisense manipulation of the genes related with flavonoid pathway, or by modified expression of regulatory genes. So, the use of a variety of experimental tools and metabolic engineering facilitated the characterization of the flavonoid metabolism. Here we review recent progresses in flavonoid metabolism: confirmation of genes, metabolic engineering, and applications in the industrial use.

Key words: Flavonoid biosynthesis, metabolic engineering

서 론

Flavonoid 생합성은 식물 이차대사의 광범위한 영역 중 하나로서, 현재까지 수천의 식물 종으로부터 약 4,500종류 이상의 서로 다른 flavonoid계 phenol화합물이 분리되어 구명되어 왔다. 식물의 잎, 줄기, 열매, 뿌리, 종자, 꽃 등 모든 부위에 분포하는 것으로 알려졌으며 식물의 성장과 발육, 미생물과 해충에 대한 방어, 인간에 대한 약리적 효과 (항균, 항바이러스, 항알레르기, 항염증), 강력한 항산화 활성 등으로 최근 그 중요성과 활용성이 강조되고 있다. Phenylpropanoid 유래의 p-coumaroyl-CoA와 acetate 유래의 malonyl-CoA 세 분자를 전

구물질로 하여 합성되며 구조적 특징으로 C₆-C₃-C₆의 골격상을 가진다. Pyran과 관련된 2개의 phenyl 환을 각각 환A와 B로 표시하는데, 주로 여러 당류와 ether 결합에 의한 배당체의 형태로 존재하는 경우가 많다.

고등식물의 flavonoid들은 6가지의 주요 subgroup, 즉 chalcone, flavone, flavanol, flavan 3,4-diol (leucoanthocyanidin), proanthocyanidin으로 구분되며, 넓은 의미로는 anthocyanin도 포함한다. 일반적으로 자외선 쪽의 흡수과장을 가지므로 무색으로 나타나지만, flavone과 flavanol은 2, 3 탄소위치에 2중 결합이 있어 노란색을 나타낸다.

현재까지 가장 광범위하게 연구되어 온 이차대사 분야 중 하나인 flavonoid는 다양한 분포와 기능에 대한 많은 정보가 밝혀져 있으므로, 앞으로 분자생물학적 수준의 화학, 유전학, 효소학 연구를 위한 모델로서 주목받고 있을 뿐만 아니라, 축

*Corresponding author Tel 031-299-1734 Fax 031-299-1732

E-mail jongsug@rda.go.kr

적된 정보들이 성공적인 대사공학을 위한 수단과 노후자가 되고 있다. 본 고찰에서는 flavonoid 대사공학에서 이루어진 최근의 발전과 산업화 이용 가능성에 대하여 언급함으로써 생명공학과 관련된 농업분야에서의 연구방향을 제시하고자 한다.

1. Flavonoids의 생리적 기능

Flavonoid 생합성 경로는 여러 대사물질들, 즉 chalcone, flavanone, isoflavonoid, flavone, flavonol, leucoanthocyanidin (flavan-3,4-diol), anthocyanin 등으로 이루어져 있으며 비교적 잘 규명되어 있다 (Figure 1). 꽃이나 과실의 착색은 pelargonidin 3-glucoside (오렌지색, 분홍색, 빨간색), cyanidin 3-glucoside (자홍색, 진홍색), 그리고 delphinidin 3-glucoside (자주색, 푸른색) 등 액포에 집적되는 anthocyanin에 기인하며

flavonoid (flavonol, flavone, chalcone, aurone)도 색깔을 결정하는 데 영향을 미치게 된다. 따라서 flavonoid 생합성 관련 효소들이나 유전자를 조작하는 연구들이 주로 페튜니아 (*Petunia hybrida*)의 착색 조절 연구를 중심으로 이루어져 왔으며 또한 다양한 flavonoid가 건강보호 및 약리적 이용 측면에서도 광범위하게 연구되어 그 효과가 규명되고 있다 (Dixon and Steele 1999; Forkmann and Martens 2001).

합성의 첫 단계로서 chalcone synthase (CHS)에 의하여 acetate 유래의 malonyl-CoA 세 분자와 phenylpropanoid 유래의 p-coumaroyl-CoA 한 분자로부터 한 분자의 tetrahydrochalcone이 생성된다. 약 42 kDa의 dimeric polyketide synthase 인 CHS는 cofactor를 필요로 하지 않으며, 동일한 작용을 하는 NADPH 의존형 reductase에 의하여 6-deoxychalcone (isoliquiritigenin)이 생성되기도 한다. 이들 2종류의 chalcone은 종에 따라서 aurones (flavonoids subclass)으로 전환되기도 한다. 또한 stilbene synthase (STS)에 의하여 p-

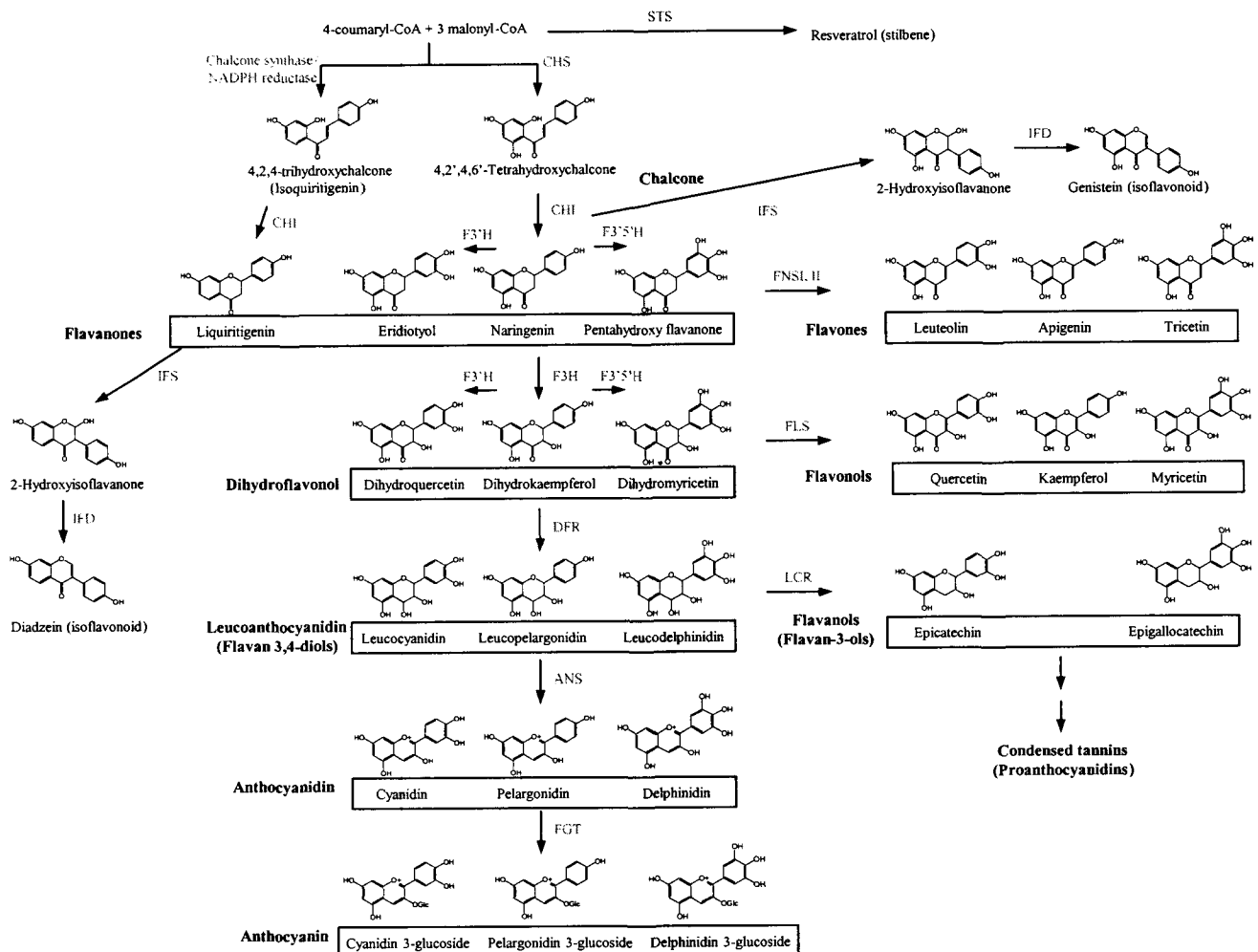


Figure 1. Scheme of the individual steps in the flavonoid pathway leading to the most important classes and the hydroxylation of the ring B. Abbreviation: ANS, anthocyanidin synthase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; DFR, dihydroflavonol reductase; FGT, UDP-glc:flavonoid 3-O-glucosyltransferase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3'5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; FNS I, flavone synthase I; FNS II, flavone synthase II; IFD, 2-hydroxyisoflavanone dehydratase; IFS, 2-hydroxyisoflavanone synthase; LCR, leucoanthocyanidin reductase; STS, stilbene synthase.

coumaroyl-CoA와 malonyl-CoA로부터 stilbene (resveratrol)이 합성되는데, 주로 포도 (*Vitis vinifera*), 땅콩 (*Arachis hypogaea*), 소나무 (*Pinus sylvestris*) 등에 존재하며 심장병을 감소시키는 효과가 보고되고 있다 (Winkel-Shirley 2001).

노란색의 tetrahydrochalcone은 chalcone isomerase (CHI)에 의한 입체 특이적인 ring closure isomerization 단계를 거쳐 무색의 naringenin이 되는데 일부는 liquiritigenin이 되기도 한다. Flavone은 두과작물과 근류 박테리아 간의 상호관계에서 질소고정을 촉진시키는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 포도 유래의 naringenin은 면역기능을 증가시키는 효과가 보고되었다. 이들 flavanones (naringenin, eriodiolyol, pentahydroxy flavanone)는 C-2-C-3 이중결합으로 flavones (apigenin, leuteolin, tricetin)와 flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) 그리고 3-위치의 hydroxylation으로 dihydroflavonols (dihydrokaempferol, dihydroquercetin, dihydromyricetin)이 된다. Naringenin은 flavone synthase (FNS)에 의하여 C-2/C-3 위치에서 dehydration되어 apigenin (flavones)이 되는데, 종에 따라 다양한 효소 형태를 가진다. 즉, 파슬리 (*Petroselinum crispum*) 세포 배양에서는 α -ketoglutarate-dependent dioxygenase (FNS I)에 의해 flavone 형성이 촉매 되나, *Antirrhinum* 꽃에서는 NADPH-dependent FNS II에 의하여 촉매 된다. 또한 naringenin은 반응시 Fe^{2+} 를 필요로 하는 α -ketoglutarate-dependent dioxygenase인 flavanone 3-hydroxylase (F3H)에 의하여 stereospecific 3-hydroxylation (또는 3'-hydroxylated analog)되어 dihydrokaempferol (dihydroflavonol)을 형성한다. dihydrokaempferol은 flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)에 의하여 dihydroquercetin이 되거나 flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3'5'H)에 의하여 dihydromyricetin이 된다. Dihydroquercetin은 F3'5'H에 의하여 dihydromyricetin이 되기도 한다.

최근 암예방을 위하여 주목받고 있는 isoflavonoid 합성은 isoflavone synthase (IFS)에 의해 flavanone (naringenin, liquiritigenin)에서 C-2에서 C-3로의 aryl 이동 및 hydroxylation이 촉매 되어 2-hydroxyisoflavanones (2-HIS)이 합성된 후, 2-hydroxyisoflavanone dehydratase (IFD)에 의하여 dehydration 되어 genistein과 diadzein이 합성된다. Naringenin은 NADPH-dependent cytochrome P450 monooxygenase와 관련 있는 특정 hydroxylation으로 직접 dihydroquercetin이 된 후, α -ketoglutarate-dependent dioxygenase인 flavonol synthase (FLS)에 의한 C-2-C-3 이중결합의 형성으로 quercetin (flavonol)이 되며, 적포도주내 quercetin의 항혈전효과가 보고되었다. 또한 dihydroquercetin은 NADPH-dependent dihydroflavonol reductase (DFR)에 의하여 환원되어 leucocyanidin (flavan-3, 4-diol 또는 leucoanthocyanidin)이 된다.

Leucoanthocyanidin은 종 또는 조직 특이적인 효소적 전환을 거쳐 구조적으로 다양한 flavonoid를 만든다. 꽃잎에서 무색의 leucoanthocyanidin (leucopelargonidin, leucocyanidin,

leucodelphinidin)은 α -ketoglutarate-dependent dioxygenase인 anthocyanidin synthase (ANS)에 의하여 anthocyanidin (cyanidin, pelargonidin, delphinidin)이 된 후 UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (FGT)에 의하여 적색, 자색, 청색 등의 색을 띠는 anthocyanin (cyanidin 3-glucoside, pelargonidin 3-glucoside, delphinidin 3-glucoside)가 합성된다. 이때 B 환의 hydroxylation 형태에 의하여 anthocyanin 종류가 결정되며, 4번 위치에 hydroxyl 기를 가지는 자색 또는 적색의 cyanidin을 기본색소로 두 개의 가변적 위치에서의 hydroxylation에 따라서 빨간색 및 오렌지색의 pelargonidin 색소 또는 자주색 및 파란색의 delphinidin 색소가 합성된다. 또한 leucoanthocyanidins은 leucoanthocyanidin reductase (LCR)에 의하여 catechin이 되며, catechin은 항암효과, 면역력 증가, 항혈전, 항뇌졸중, 항산화 등 다양한 복합기능이 규명되었다. Catechin은 condensing 효소에 의하여 condensed tannins이 되나, coupling 단계, chain extension 대사, 산화적 modification이 관계되는 것으로 알려진 condensing 과정은 현재까지 제대로 규명되지 않고 있다.

2 Flavonoid 생합성에 관여하는 구조 유전자

Flavonoid 대사에 관한 생화학적 특성들은 오랜 시간에 걸친 수많은 효소들의 분리와 효소학적인 규명을 통하여 밝혀져 왔다. 구조 유전자는 한가지 이상의 생합성 단계들을 조종하고, 조절 유전자는 flavonoid의 농도에 영향을 미치거나 유도하여 대사 전체 혹은 일부를 switch on 또는 off 하며 이들 유전자들은 액포의 pH, co-pigmentation, 금속이온 등의 영향을 받는다. Flavonoid 대사 관련 효소들은 조직으로부터 쉽게 대량분리가 가능하여 현재까지 많은 부분이 밝혀졌다. Anthocyanins 합성 반응은 chalcone synthase (파슬리), chalcone isomerase (콩 종자, 콩 세포배양), flavanone 3-hydroxylase (페튜니아), dihydroflavonol 4-reductase (옥수수), anthocyanidin synthase (옥수수), flavonoid 3-O-glucosyltransferase (옥수수)에 의하여, 그리고 나머지 flavonoids는 anthocyanidin 형성 과정의 중간산물 유도체로서 leucoanthocyanidin reductase (LCR), flavone synthase I 또는 II (FNS I, FNS II), flavonol synthase (FLS) 그리고 isoflavanone synthase (IFS) 등에 의하여 촉매된다 (Holton and Cornish 1995). 다양한 종류의 flavonoid가 hydroxylation, hydroxyl기의 methylation, glycosylation, acylation 등의 반응들을 거쳐서 형성된다. Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)와 flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3'5'H)는 특히 주목을 받는 효소로서 기질인 naringenin과 dihydrokaempferol에서 B환의 적정 위치에 hydroxyl기를 유도하여 luteolin과 tricetin (flavone), quercetin과 myricetin (flavonol) 그리고 cyanidin과 delphinidin (anthocyanidin) 등의 유용 flavonoid를 합성하게 한다. 현재까

지 많은 대사 관련 유전자들이 분리 규명되어 왔는데, proanthocyanidin 형성에 필요한 'condensing enzyme' 을 제외하고 Figure 1에서 표시한 효소들의 구조 유전자들이 분리되었으며 유전자 발현에 관련된 transcription factor에 해당하는 몇몇 조절 유전자들도 분리 규명되었다. 지금까지 이러한 대사관련 유전자들의 유전적, 생화학적, 분자생물학적인 더 자세한 정보들에 대한 많은 고찰들이 이루어져 왔다 (Holton and Cornish 1995; Mol et al. 1998; Forkmann and Martens 2001).

Table 1은 flavonoid 생합성에 관련된 유전자들의 분리 역사에 대한 고찰로, 주 합성경로 관련 효소들의 경우, 그 유전자 대부분이 효소 특성으로부터 얻은 정보 또는 분리한 단백질에 대한 항체를 이용하여 분리되었다. 또한 식물체내의 낮은 축적 농도로 인하여 조절 단백질의 생화학적 분석이 용이하지 않으므로 대부분은 transposon을 이용하여 분리되었으며, 최근에는 T-DNA tagging이 유용하게 이용되고 있다. 특히 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)로부터 flavonoid 생합성에 관련된 유전자들을 분리하는 실험이 활발히 수행되고 있는데,

flavonoid 생합성에 직간접적으로 관련된 구조 유전자들에 대한 돌연변이체가 밝혀져 몇몇 남아있는 의문점들을 해결하는데 매우 유용하게 이용되고 있다 (Devic et al. 1999). Federoff 등 (1984)이 처음으로 transposon tagging 방법을 이용하여 UDP-Glc: flavonoid 3-O-glucosyl transferase 유전자인 *bronze 1* 유전자를 분리하는데 성공한 이래로 chalcone synthase는 파슬리에서 (Kreuzaler et al. 1983), isoflavonoid 대사 관련 효소 유전자들은 콩과 알팔파에서 분리되었으며, 구조 유전자들의 대부분은 옥수수과 페튜니아에서 분리되었다. 또한 옥수수, 페튜니아, 애기장대에 대한 transposon과 T-DNA tagging을 이용한 대사 관련 연구에서 flavonoids의 합성장소인 cytoplasm으로부터 저장장소인 액포로의 이동에 관련된 유전자에 대한 정보가 밝혀지고 있다 (Debeaujon et al. 2001).

2.1 Chalcone Synthase (CHS)

첫 단계에 관여하는 생합성 유전자로서 파슬리로부터 처음

Table 1. History of flavonoid gene isolation.

Gene	Method	Species	Citation
Structural genes			
Chalcone synthase (CHS)	Antibody screening	Parsley	Kreuzaler et al. (1983)
Chalcone isomerase (CHI)	Antibody screening	Bean	Mehdy and Lamb. (1987)
Isoflavonoid synthase (IFS)	Cytochrome P450 homology	Soybean, Licorice	Akashi et al. (1999) Steele et al. (1999) Jung et al. (2000)
Flavonol synthase (FLS)	Dioxygenase homology	Petunia	Holton et al. (1993)
Flavanone 3-hydroxylase (F3H)	Antibody screening	Petunia Snapdragon	Britsch et al. (1992) Martin et al. (1991)
Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)	Cytochrome P450 homology	Petunia	Brugliera et al. (1999)
Flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H)	Cytochrome P450 homology	Petunia	Holton et al. (1993)
Dihydroflavonol reductase (DFR)	Transposon tagging	Snapdragon	Coen et al. (1986)
Leucoanthocyanidin reductase (LCR)	T-DNA tagging	Arabidopsis	Devic et al. (1999)
2-Hydroxyisoflavanone synthase (IFS)	Analysis of cytochrome P450S	Soybean Licoric	Akashi et al. (1999)
UDP-Glc:flavonoid 3-O-glucosyl transferase	Transposon tagging	Maize	Federoff et al. (1984) Dooner et al. (1985)
Anthocyanidin synthase (ANS) (Leucoanthocyanidin dioxygenase)	Transposon tagging	Maize	Menssen et al. (1990)
Regulatory genes			
<i>C1</i> (myb)	Transposon tagging	Maize	Cone et al. (1986)
<i>Lc</i> (basic Helix Loop)	Transposon tagging	Maize	Ludwig et al. (1989)
<i>P</i> (myb)	Transposon tagging	Maize	Lechelt et al. (1989)
<i>CPRF1</i> , <i>CPRF2</i>	Southwestern screening	Parsley	Weisshaar et al. (1991)
<i>delilah</i> (bHLH)	Transposon tagging	Snapdragon	Goodrich et al. (1992)
<i>anthocyanin 11</i> (WD40)	Transposon tagging	Petunia	de Vetten et al. (1997)
<i>TRANSPARENT TESTA GLABRA2</i> (WRKY)	Transposon tagging	Arabidopsis	Johnson et al. (2002)
<i>anthocyanin2</i> (bHLH)	Transposon tagging	Petunia	Quattrocchio et al. (1999)
<i>TRANSPARENT TESTA 1</i> (WD40)	Positional cloning	Arabidopsis	Walker et al. (1999)
<i>anthocyanin 1</i> (bHLH)	Transposon tagging	Petunia	Spelt et al. (2000)
<i>TRANSPARENT TESTA 8</i> (bHLH)	T-DNA tagging	Arabidopsis	Nesi et al. (2000)
<i>PAP1</i>	Activation tagging	Arabidopsis	Borevitz et al. (2000)

분리되었으며 (Kreuzaler et al. 1983), 이를 이용하여 페튜니아에서 두 종류의 또 다른 CHS 유전자들이 추가 분리되었다. 페튜니아에는 12개의 서로 다른 CHS 유전자가 존재하며 이들 중 단지 4종류 (*chsA*, *chsB*, *chsG*, *chsJ*), 그 중 꽃에서는 2종류 (*chsA*, *chsJ*)만 발현되는 것으로 보고되었다. Transposon tagging을 이용하여 옥수수로부터 2종류의 CHS 유전자가 분리되었으며, *c2*는 종자의 anthocyanin 생합성, *whp*는 화분의 CHS 활성 조절에 관계하는 것으로 규명되었다. 또한 금어초 genome은 단지 1개의 CHS 유전자만 보유하고 있다.

2.2 Chalcone Isomerase (CHI)

Chalcone은 CHI에 의하여 naringenin이 되어버리므로 식물 조직내의 축적량은 미미하다. 또한 CHI가 없는 경우라도, 늦은 속도이긴 하지만 자연적으로 isomerization되어 naringenin을 형성한다. 그러나 CHI mutant에서 chalcone 축적을 보이는 몇몇 예가 확인되었다. CHI 활성이 결핍된 과꽃 (*Callistephus chinensis*)과 카네이션의 corollas (꽃부리)에서 chalcone 색소의 축적으로 꽃이 노란색으로 착색되었다.

CHI cDNA는 항체를 이용하여 콩으로부터 최초로 분리되었다 (Mehdy and Lamb 1987). 또한 페튜니아 꽃눈으로부터 분리한 CHI 효소의 antiserum을 이용하여 페튜니아 꽃잎의 cDNA expression library로부터 CHI 단편을 분리하였다. 현재 2종류의 CHI 유전자 (*chiA*, *chiB*)가 분리되고 그 특성이 규명되었으며 (van Tunen et al. 1988, 1989) 이들 유전자를 이용하여 금어초와 옥수수 CHI 유전자들도 분리되었다.

2.3 Isoflavanone Synthase (IFS)

Isoflavonoid 경로에 대한 연구에서 생화학적, 유전적 자료들은 IFS가 cytochrome P450 oxygenase family에 해당한다고 암시하여 왔다. 이러한 사실은 감초 (*Glycyrrhiza echinata*)로부터 IFS를 분리함으로써 규명되었으며 (Akashi et al. 1999) Richard Dixon 그룹도 P450 cDNA의 functional screening에 의하여 콩 (*Glycine max*)으로부터 IFS 유전자를 분리하였다 (Steele et al. 1999). 최근 DuPont사의 한 그룹은 같은 screening 방법을 이용하여 yeast expression system에 의해 IFS를 분리하였다 (Jung et al. 2000).

2.4 Flavanone 3-Hydroxylase (F3H)

Differential screening과 genetic mapping을 이용하여 금어초의 *incolorata* locus에 해당하는 cDNA 단편이 분리되었으며 이것이 F3H인 것으로 알려졌다 (Martin et al. 1991). 또한 페튜니아의 꽃잎으로부터 F3H cDNA가 분리되었는데, 아미노산 간의 서열 비교 및 대장균내 발현 시 hydroxylase 활성 등을 통하여 기능이 입증되는데 금어초와 페튜니아간에는 높은 상

동성을 보였다. 페튜니아 F3H cDNA 단편을 이용하여 카테이션, 과꽃 등으로부터 해당 cDNA가 분리되었으며, 이는 reticulocyte system을 이용하여 확인되었다.

2.5 Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H)

분리하는 데 오랜 시간이 소요된 F3'H 유전자는 염기서열 유사성을 이용하여 확보되었다. 유전형이 확인된 페튜니아의 꽃 추출물에서 효소 활성이 밝혀졌는데, naringenin과 dihydrokaempferol의 3' 위치의 hydroxylation을 촉매하였다. 두 개의 genetic loci *Ht1*과 *Ht2*는 페튜니아의 꽃에서 F3'H 활성을 조절하는데, *Ht1*은 corolla의 limb와 tube에서, *Ht2*는 corolla tube에서 작용한다. 이들 두 유전자는 anthocyanin과 flavonol의 3'-hydroxylation을 조절하는데, F3'H에 해당하는 cytochrome P-450 cDNA 단편이 페튜니아로부터 분리되었다 (Brugliera et al. 1999).

Larson과 Bussard (1986)는 옥수수 유묘로부터 얻은 microsome 분획에서 F3'H의 존재를 확인하였는데 kaempferol, naringenin, apigenin을 기질로 이용하며, cytochrome P-450 superfamily에 해당하는 것으로 밝혀졌다.

2.6 Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (F3'5'H)

수년 전 Florigene 그룹은 P-450의 염기서열 유사성을 기초로 페튜니아로부터 두 종류의 F3'5'H 유전자를 분리하였는데, 꽃에서 특히 높은 발현양상을 확인하였다 (Holton et al. 1993). F3'5'H는 두 개의 유전 loci (*Hf1*, *Hf2*)와 상관관계를 보였으며, *Hf1*은 corolla, stigma, pollen에서, *Hf2*는 corolla limb에서 특이적으로 작용하였다. F3'5'H 효소는 cytochrome P-450 superfamily에 해당한다. 포유류에는 약 200종 이상의 서로 다른 P-450 염기서열이 얻어졌고 이들 간에는 일부 보존된 염기서열 부위를 가지므로, PCR용 degenerate oligonucleotide primers를 설계하는데 이용되고 있다. Holton 등 (1993)은 페튜니아로부터 두 개의 full-length P-450 유전자의 cDNA 단편들을 분리하였으며 효모 발현을 통하여 F3'5'H 활성을 확인하였다. 또한 페튜니아 돌연변이체에 대한 RFLP mapping과 complementation 결과 각각 *Hf1*과 *Hf2* genetic loci에 해당함을 확인하였다.

2.7 Dihydroflavonol 4-Reductase (DFR)

DFR 유전자는 옥수수와 금어초로부터 transposon tagging을 이용하여 분리되었다. 옥수수의 *al* 유전자 recessive mutation은 무색의 호분층을 유발하였으며 *in vitro* translation을 통하여 *al* cDNA 단편이 DFR임이 확인되었다 (Reddy et al. 1987).

금어초의 *pal* locus에 대한 돌연변이 결과 anthocyanin 생합성이 차단되어 무색 또는 일부만 착색되는 꽃을 유발하였으

며, *pal* mutant에 leucocyanidin을 공급할 경우 anthocyanin이 합성되나, dihydroquercetin을 공급할 경우에는 합성되지 않는 precursor feeding 실험을 통하여 *pal* 유전자가 DFR를 인식함이 증명되었다. *Pal* 유전자의 산물들 간에는 아미노산 상동성을 보였으며, 금어초의 DFR cDNA 단편이 페튜니아의 homologous 유전자를 분리하는데 사용되었다 (Beld et al. 1989). 페튜니아에는 3종류의 DFR 유전자 (*dfrA*, *dfrB*, *dfrC*)가 있는데, *dfrA* 유전자만이 화기 조직에서 전사되고 RFLP mapping과 complementation을 통하여 *An6* locus에 해당하는 것으로 밝혀졌다. 페튜니아의 DFR 효소는 선택적으로 dihydromyricetin만을 기질로서 선호하여 leucodelphinidin으로 변환시키며, dihydroquercetin과 dihydrokaempferol에 대하여는 기질로서의 선호도가 낮거나 기질로 이용되지 않으므로 leucopelargonidin은 생성되지 않았다. 이러한 페튜니아의 기질 특이성으로 인하여 결국 delphinidin 유도체들의 선택적인 축적과 pelargonidin 색소의 결핍이 나타난다.

2.8 Leucoanthocyanidin Reductase (LCR)

최근 flavonoid 생합성에 관여하는 몇몇 중요한 유전자들이 구명되었는데, 최근 분리된 LCR은 leucoanthocyanidin으로부터 catechin을 합성함으로써 proanthocyanidin 생합성 초기단계 조절하는 것으로 밝혀졌다. Devic 등은 T-DNA tagging을 이용하여 *Arabidopsis* 유래의 *BANYULS* 유전자가 이에 해당함을 밝혔다 (Devic et al. 1999).

2.9 Anthocyanidin Synthase (ANS)

Leucoanthocyanidins을 유색 anthocyanidins으로 변환하는 효소 단계는 아직 잘 규명되어있지 않으나 oxidation과 dehydration이 관여하는 것으로 알려졌다. 옥수수의 A2 유전자 mutation은 leucoanthocyanidins에서 anthocyanidins으로의 효소적 변환이 차단되었으며, 금어초의 *Candica* (*Candi*) 유전자도 동일한 단계에 관여하는 것으로 알려졌다. 현재 A2와 *Candi* 유전자는 분리되었는데 (Menssen et al. 1990; Martin et al. 1991) 이들의 아미노산 서열 간에는 높은 상동성을 보였으며 F3H, flavonol synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase 등과 같은 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase와도 상동성을 보였다.

2.10 Anthocyanin Glycosyltransferases (FGT)

옥수수의 UDP glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (3GT)에 해당하는 *Bz1* 유전자가 transposon tagging에 의하여 분리되었으며 (Dooner et al. 1985), 이를 이용하여 금어초와 페튜니아 유래의 FGT 유전자도 분리되었다. 금어초와 페튜니아의 anthocyanin 3-glucosides는 rhamnosylation에 의해

anthocyanidin 3-rutinosides이 된다. Differential screening과 genetic mapping을 이용하여 페튜니아로부터 UDP rhamnose: anthocyanidin-3-glucoside rhamnosyltransferase (3RT) 유전자가 분리되었는데, 이는 *Rt* locus에 해당하며, 3GT 및 다른 glycosyltransferases와 염기서열 상동성이 낮았다. 페튜니아 꽃에서 발견되는 anthocyanins은 3 위치에서 glucose기를 가지나, 유전적 배경에 따라 5 위치에서 glucose기를 가질 수도 있는데, 이러한 anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase (5GT) 활성은 다양한 anthocyanin 유전자들의 발현을 조절하는 *An1* 조절 유전자와 상관관계가 있는 것으로 알려졌다.

3. Flavonoid 생합성에 관여하는 조절 유전자

구조 유전자의 발현을 조정하는 조절 유전자들은 flavonoid 생합성 정도와 경향에 영향을 미친다. Table 1에서 옥수수, 금어초, 페튜니아, 애기장대 등에서 분리된 조절 유전자들을 요약하였으며, 이들은 효소 분석과 구조유전자의 mRNA 분석을 통하여 규명되었다. Flavonoid 생합성 조절에 대한 이해는 transposon tagging과 positional cloning과 같은 분자유전적 방법을 이용하여 최근 큰 발전이 이루어졌다. 이러한 방법들을 이용하여 대사경로를 유도하는 signals과 옥수수의 myb domain과 helix-loop-helix transcription factor (R, B, C1, P)를 연결시켜 주는 몇몇 새로운 조절단백질들이 밝혀졌다.

특히 proanthocyanidin과 anthocyanin 생합성에 특이적인 대사경로의 마지막 단계 효소들의 발현을 조절하는 유전자들의 규명에 있어서 큰 발전이 이루어졌다. 페튜니아의 *AN1* (de Vetten et al. 1999), 애기장대의 *TTG1* (Walker et al. 1999)은 heterotrimeric G 단백질의 β -subunit에 관여하는 것으로 알려졌다. *AN1*은 세포질 단백질로서 최근 분리된 myb domain을 가지는 단백질인 *AN2*의 발현을 조절한다 (Quattrocchio et al. 1999). *TTG1*은 그 역할이 flavonoid 합성에 관여할 뿐만 아니라 뿌리의 표피세포 형태, 종자의 점액 생성 등에서 *AN1*과 차이를 보인다. Phenylpropanoid 대사의 MYB 조절인자 외에도 최근 애기장대에서 *PAP1*이 분리되었으며 대량 발현 시 절은 자주색 꽃을 피게 하는 것으로 보고되었다 (Borevitz et al. 2000).

R gene family는 maize의 anthocyanin 색소의 축적 시기, 분포, 양 등을 결정하며, *R* locus (*S*, *Lc*, *Sn* 등을 포함)과 *B* locus로 이루어진 일련의 조절 유전자들이 이에 해당된다 (Dooner et al. 1991). 각 유전자는 식물 각 부위의 착색을 결정하는데, 조직내의 충분한 anthocyanins의 축적은 *C1* (종자) 또는 *P1* (식물 조직)을 필요로 한다. Viviparous-1 (*Vp1*)은 developing maize seed에서 *C1* 유전자의 조절을 통하여 anthocyanin 경로를 조절한다. 그러나, anthocyanin이 결핍된 *vp1* mutants는 종자 성숙도 이루어지지 않는다.

금어초의 꽃에서, 3가지 flavonoids 조절 유전자들, 즉 *Delila*

(*Del*), *Eluta*, *Rosea*가 알려졌는데, 처음 CHS와 CHI 두 단계는 큰 조절을 받지 않으나, 그 이후의 단계들에서 *Del* 유전자를 절대적으로 필요로 하며, *Eluta*와 *Rosea*에 의하여 양적인 조절을 받았다. *Del* 유전자의 mutation은 화관에서 DFR, F3H, Candi, 3GT 등의 생합성 유전자의 전사를 감소시켜 *Del* 유전자 산물의 전사 활성으로, flower lobe와 mesophyll에서는 CHS의 repressor로 작용하는 것으로 밝혀졌다.

페튜니아에서 4개 locus (*An1*, *An2*, *An4*, *An11*)의 mutation 결과 DFR, ANS, *An13*, anthocyanin methyltransferase (AMT), *chsJ* 등 구조 유전자들의 전사에 대한 조절 효과가 나타났다. *An1*과 *An11*은 식물의 모든 조직에서, *An2*는 flower limb에서, *An4*는 약에서 동일한 구조 유전자들의 전사를 조절한다. 3GT 효소 활성은 *An1*, *An2*, *An4*에 의하여 조절되며, *An1*은 *Hfl*과 관련된 F3'5'H 활성을 조절한다. 따라서 petunia 조절 유전자는 F3'H를 제외한 F3H 이후의 모든 flavonoid 유전자의 모든 기본적인 발현을 조절하였다.

Transposon tagging은 유전자 산물의 특징에 관한 정보가 없는 조절 유전자들의 분리에 유용한 방법으로 이용되어 왔으며, 다른 조절 유전자들은 먼저 밝혀진 조절 유전자들에 대한 상동성을 기준으로 분리되어 왔다. Transposon tagging에 의하여 분리된 페튜니아의 *An2* 유전자는 아미노산 수준에서 옥수수의 *C1* 및 *P1* 유전자와 가장 높은 상동성을 보였다. *An2* 유전자는 corolla 와 tube에서 발현되었으나, 약에서는 발현되지 않았다.

PCR 기법을 이용하여 페튜니아로부터 옥수수 *R* 유전자와 유사한 *jaf13*을 분리하였는데, 아미노산 수준에서 *jaf13*은 *R*과 *Del* 산물에 광범위한 상동성을 보일 뿐만 아니라, 발현 양상과 RFLP 분석결과 *jaf13*은 *An4* 유전자에 해당함을 보여 주었다.

Maize *Lc* 유전자를 담배와 애기장대에 형질전환 결과 몇몇 부위에서 색소 증가를 보였는데, 이는 *Lc*가 maize 이외의 다른 종 유래의 flavonoid 생합성 유전자를 활성화 할 수 있음을 의미한다. *Del*을 형질전환한 토마토는 꽃과 영양 조직들에서 flavonoid 합성이 증가되었으나, 형질전환 담배에서는 꽃에서만 flavonoids가 증가되었다. 그러나 형질전환 *Arabidopsis*에서는 *Del*이 뚜렷한 표현형의 효과를 나타내지는 않았다. 따라서 비록 약간의 차이는 있지만, flavonoid 생합성은 서로 다른 종들에서 유사한 요인들에 의하여 조절됨을 알 수 있다.

4. 대사공학

식물의 다양한 부위에 존재하는 flavonoid는 식물의 정상적인 성장, 분화뿐만 아니라 착색에 관여하기도 하며 식물의 생화학, 물리, 생태에 있어서 많은 기능을 한다. 즉, UV에 대한 방어, 병원 미생물 또는 해충에 대한 회피, 화분 입성과 발아 유전자의 활성화 그리고 식물 생장과 효소활성을 조절하는

기능을 가진다. 또한 식물의 착색은 꽃가루 수분과 종자의 전파를 위하여 유리 할 뿐만 아니라, 인간에게 미적인 가치를 부여하기도 한다. 특히 free radical 과 reactive oxygen species 에 대한 항산화효과는 인간의 음식과 동물 사료에서의 건강 방어 역할로서의 주목을 받고 있다. 다양한 식물 유래의 flavonoid 대사 구조 유전자와 조절 유전자들이 잘 구명되어 화훼산업, 작물의 영양분 증대 등 대사공학 측면에서 주목을 받고 있으며, 최근까지 flavonoid에 대한 대사공학을 이용한 결과들을 Figure 2에서 요약하였다.

4.1 화훼작물의 착색 조절

최근의 분자생물학의 발전, 특히 유전자 분리 및 형질전환 기술의 발달로 이를 이용한 화색 변경이 가능하게 되었는데, 이러한 유전공학 기술은 새로운 효소 유전자의 도입과 내재 유전자의 불활성화의 방향으로 이용되어 왔다.

Flavonoid는 chlorophyll과 carotenoid 다음으로 식물계에서 가장 많이 존재하는 색소이다. 화색 특히, 푸른색과 노란색의 재배종 생산은 장식용 식물 육종에 있어서 중요한데, 전통적인 방법과 분자생물학적인 방법을 혼합한 대사공학은 기존 내재 요인들을 변화시키지 않고 재배종들의 새로운 화색을 창출할 수 있는 강력한 수단이 되고 있다 (Elomaa and Holton 1994; Tanaka et al. 1998). 다른 식물 유래의 DFR 유전자를 발

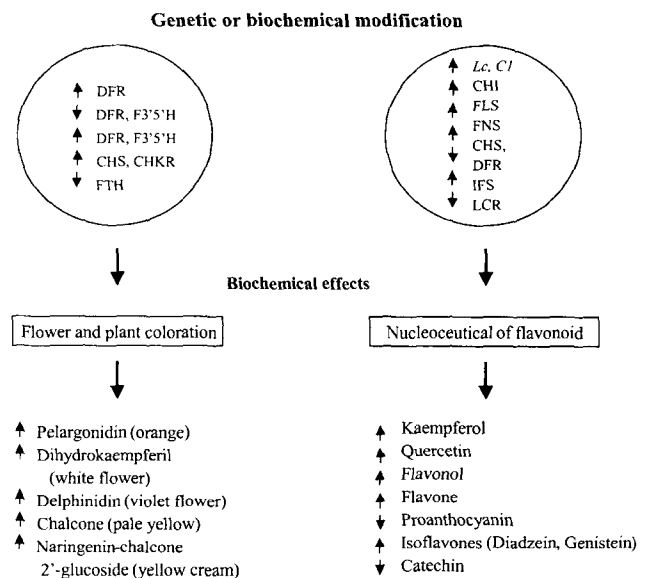


Figure 2. Modification of flavonoids and their applications. The modification and levels of flavonoids can be controlled via genetic and biochemical means. The resulting changes can alter the properties and applications of flavonoids. An arrow pointing upwards an increase in the level of an enzyme; an arrow pointing downwards indicates a decrease in the level of an enzyme. Abbreviation: CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; DFR, dihydroflavonol reductase; FHT, flavanone 3-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3'5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; FNS, flavone synthase; IFS, 2-hydroxyisoflavanone synthase; LCR, leucoanthocyanidin reductase.

현하여 pelargonidin을 합성함으로써 페튜니아의 꽃을 오렌지색으로 바꾼 성공적인 대사공학술 (Meyer et al. 1987) 시발로 하여, 선택 식물 종들에 대한 새로운 유전자의 도입, antisense 또는 sense suppression에 의한 flavonoid 합성 억제 등을 포함한 많은 연구가 이루어졌다.

페튜니아와 *Dianthus* (패랭이과)의 flavonoid 생합성에 관한 발표들에서 (Forkmann and Ruhau 1987; Stich et al. 1992) Florigene 실험실과 Suntory 실험실은 delphinidin 유도체를 도입함으로써 자연계에는 존재하지 않는 보라색 꽃의 형질전환 *Dianthus*을 개발하였다. 또한 DFR과 F3'H 활성을 모두 억제하여 dihydrokaempferol만을 합성하는 흰 재배종 꽃을 선발하였다. Dihydromyricetin만을 기질로 받아들이고, dihydrokaempferol은 기질로 받아들이지 않는 페튜니아 유래의 DFR과 F3'5'H 유전자를 동시에 도입한 실험에서, 두 효소의 동시 발현이 dihydrokaempferol을 hydroxylation 하여 dihydromyricetin (F3'5'H)을 생성하였으며, 이는 페튜니아 DFR에 의하여 leucodelphinidin으로 바뀌어 결국 식물 내부 효소들에 의한 delphinidin 유도체가 되었다. 이 보라색 꽃을 피우는 *Dianthus*는 'Moondust™'과 'Moonshadow™'이라는 상품명으로 한 최초의 형질전환 화훼작물로 시판되었다. 그러나 현재까지 진정한 파란색 *Dianthus* 꽃은 생산되지 않고 있는데, 이는 주로 액포내 pH의 부적절한 조건과 co-pigmentation에 기인하는 것으로 알려졌다. F3'5'H 유전자의 도입으로 delphinidin이 형성된 푸른색 재배종인 *Dendratherma*, *Dianthus*, *Rosa* 등이 개발되었으나, cyanidin 및 pelargonidin 유래의 anthocyanin 들이 여전히 존재하였다.

Chalcone 합성조절을 통한 새로운 시도로 페튜니아에서 연한 노란색의 꽃이 개발되었다. 알팔파 유래의 chalcone ketide reductase (CHKR) 유전자를 페튜니아에서 발현시킨 결과, 내재 CHS와 도입 CHKR의 상호작용으로 6'-deoxychalcone isoliquiritigenin이 합성되었다. Isoliquiritigenin은 petunia CHI의 기질이 아니므로, 꽃에 상당량의 chalcone이 축적되어 연한 노란색으로 착색되었다 (Davies et al. 1998). 고농도의 chalcone에 의한 노란색 꽃의 생산은 isoliquiritigenin의 glycosylation과 hydroxylation에 의하여 가능하며 이러한 CHKR의 도입으로 CHS 활성이 높은 모든 식물 종들에서 성공할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 flavonoid 대사에 관한 연구들을 통하여 DFR 및 ANS 단계들이 손상된 꽃잎에서의 anthocyanin 형성이 규명되었다. *Antirrhinum* 유래의 DFR 유전자와 *Matthiola* 유래의 ANS 유전자를 도입한 형질전환 *Forsythia* (개나리속)는 노란 carotenoid 배경색에 anthocyanin이 합성되어 연한 갈색의 꽃을 피우게 된다.

de Vetten 등 (1999)은 페튜니아에서 F3'5'H의 활력을 위해 꽃 특이적인 cytochrome *b₃*가 필요하다고 보고하였으나, 다른 cytochrome P-450 효소들의 활성에 대한 효과는 관찰하지 못하였다. Cytochrome *b₃*를 인식하는 *diff* 유전자는 꽃에서 광범위하게 발현된다. 최근 Florigene 그룹은 카네이션에 F3'5'H와

cytochrome *b₃* 유전자를 도입하여 적색의 꽃을 짙은 자주색을 변환시키는데 성공하여, 파란장미의 실현이 가능함을 제시하였다 (Brugliera et al. 2000). *Dianthus* 꽃에 *diff* 유전자를 *Petunia* F3'5'H 유전자와 함께 도입 발현시킨 결과 delphinidin 유도체들을 강하게 축적되어 거의 검은 꽃이 나타났다 (Koes et al. 2000). 오렌지색 꽃을 피우는 *Dianthus* 재배종인 'Eilat'에 antisense *FHT*를 형질전환한 결과 노란색 꽃을 생산하게 되는데, 이는 naringenin-chalcone 2'-glucoside 축적에 기인하는 것으로 알려졌다 (Vainstein et al. 2000). 그러나 anthocyanin 형성의 억제 외에 형질전환 꽃들의 향기의 강도는 control 꽃들보다 훨씬 높았는데 이는 methylbenzoate의 수준이 강하게 상승하였기 때문이다. 따라서 antisense *FHT*는 flavonoid 생합성 억제하여 대사 흐름을 phenylpropanoid pathway에서 유래하는 benzoic acid 생합성 방향으로 변경시켰다 (Vainstein et al. 2000 patent). 그러나 flavonoid 생합성과 관련한 착색의 경우 액포내 pH와 cytochrome *b_{5s}* 등의 복잡한 요인들로 인하여 꽃과 식물의 착색 변화의 괄목할 만한 발전이 이루어졌음에도 불구하고 아직 규명하여야 할 부분들이 많이 남아있다.

4.2 영양학적 측면에서의 flavonoid 대사조절

지금까지 많은 건강 보호 기능들 특히, 항산화, 항암, 항염증, 항동맥경화 등의 활성이 보고되었으나 영양원으로 섭취하는 주곡작물들의 경우 flavonoid 함량이 부족하거나 관련조직에서 소량만이 존재하므로, 조성뿐만 아니라 양을 증대시키기 위한 대사공학이 활발히 이루어져 왔다.

최근 토마토 과실에서 영양학적으로 유용한 flavonol 함량을 증대시키기 위하여 페튜니아 *CHI* 유전자가 이용되었다 (Muir et al. 2001). 토마토의 과실 껍질에는 소량의 kaempferol과 quercetin이 존재하는데, 옥수수 유래의 *Lc*와 *C1* 등 조절 유전자를 도입 대량 발현시켜 과육의 kaempferol 함량을 60%까지 높였고, 페튜니아 유래의 *CHI* 유전자를 발현시켜 껍질에서 quercetin 함량을 70%까지 증대시켰다. 또한 감자에서 *Lc*와 *C1* 유전자를 발현시킨 실험에서도 tuber에서 많은 양의 kaempferol이 축적되었다 (de Vos et al. 2000). 다른 식물체 유래의 *FLS* 유전자를 이용한 flavonol 합성의 증대를 가능하게 할 수 있으며, 최근 분리된 *FNS* 유전자들을 이용하면, 영양학적 측면에서 주곡작물의 flavone 양을 증대시킬 수 있다 (Martens and Forkmann 1999).

Isoflavone은 인간의 호르몬 관련 병의 치료와 예방 측면에서 주목받고 있으며, 식물성 호르몬 (phytoestrogens)으로서 작용한다 (Setchel et al. 1998). 여성호르몬인 estrogen과 유사한 역할을 하는 대체물로 밝혀지면서 많은 연구와 실험들이 이루어져 왔는데, 대표적인 주요 활성물질로는 diadzein과 genistein이 알려져 있다. 최근 식물성 isoflavone은 엔돌핀, 세라토닌과 같은 뇌신경전달 호르몬의 상승, 골다공증, 비만, 혈

관벽 강화, 노화방지, 암 발생 억제, 심혈관계 질환 억제 등 생리적으로 매우 중요한 역할들을 수행하는 것으로 밝혀졌다 (Dixon 1999). Isoflavones은 주로 두과작물에서 2-hydroxyisoflavanone synthase (IFS)에 의하여 합성되며, 최근 관련 유전자가 분리됨으로서, isoflanones이 결핍되어 있는 주곡작물들에 isoflanones이 형성되도록 하는 대사공학적 접근이 가능하게 되었다 (Yu et al. 2000). 첫 번째 성공적인 실험이 애기장대에서 보고되어졌다 (Jung et al. 2000). 콩에서 분리한 IFS 유전자를 TMV 35S promotor를 이용하여 두과에 속하지 않는 식물에서 발현시킨 실험에서 naringenin이 약리적으로 주목을 받는 phytoestrogens인 isoflanone genistein으로 전환되었다 (Setchell and Cassidy 1999). 최근에는 담배와 옥수수에서도 IFS를 도입하여 genistein을 합성하였으며 (Yu et al. 2000) 또한 IFS1과 함께 chalcone reductase의 동시발현은 또 다른 기질인 liquiritigenin을 공급하여 옥수수에서 diadzein 합성이 가능하게 하였다.

몇몇 사료작물들에서 condensed tannins (proanthocyanidins)의 축적량의 증대는 반추동물의 bloat safety와 단백질 방어 역할을 부여하게 된다. 최근 *Lotus corniculatus*에 CHS와 DFR의 역방향 기법을 이용한 형질전환 결과, 잎과 줄기에서 각각 proanthocyanidin이 감소하거나 증가된 결과가 보고되었다. 또한 *Antirrhinum* 유래의 DFR 유전자를 도입한 실험에서도 유사한 결과들을 관찰하였다 (Robbins et al. 1998). 다른 연구분야로서 옥수수의 transcription factor인 Sn을 *L. corniculatus*에 도입함으로써 proanthocyanin 합성을 억제한 보고가 있다 (Damiani et al. 1999). 사료작물들의 질을 향상시키기 위한 구체적인 접근은 condensed tannin의 생합성 경로 규명과 관련 유전자들의 분리가 이루어지면 가능하게 될 것이다. 최근 애기장대에서 leucoanthocyanidin reductase (LCR)을 비롯한 생합성 유전자가 분리됨으로서 사료 작물에서 condensed tannins (proanthocyanidin) 생산을 조절하는 것이 가능하게 되었다. 특히 LCR에 의한 leucoanthocyanidin으로부터 카테킨을 생합성하는 대사공학적 접근이 가능하게 되었는데 (Devic et al. 1999), 카테킨은 항암, 면역력 증가, 항혈전, 항뇌졸중 등 다양한 복합기능뿐만 아니라 많은 수산기의 결합력에 의한 항산화력도 높아서 최근 식물대사공학 측면에서 주목받는 생리활성 물질이다. 그러나 카테킨을 전구물질로 하는 condensed tannins 합성 단계에 대하여는, 효소학적 coupling, chain-extension 대사, 산화적 조절 등이 아직 밝혀지지 않아 앞으로 규명되어야 할 분야로 남아있다.

적 요

주요 농작물에서 건강-방어용 flavonoids 생성, phytoalexin (isoflavonoid, flavanol, proanthocyanidin)의 생성 및 조절을 통한 식물의 저항력 증대, 색소 (flavonol, anthocyanin)의 합성

에 의한 자외선 방어, nod 유전자 inducer (flavones, isoflavones)의 대량 발현에 의한 혹 형성 (nodulation) 효율 증대 등은 대사공학 적으로 향상 가능한 부분들이다. 파란 꽃을 개화하는 품종이 카네이션, 국화, 장미 등 중요 장식용 화훼작물들에는 결핍되어 있는데, 이는 F3'5'H 유전자가 없어서 파란색 delphinidin 색소를 생산할 수 없기 때문에 추정된다. 따라서 F3'5'H 유전자를 형질전환 하여 이러한 제한을 극복하고 delphinidin 유도체 생산이 가능하게 되면 파란색 꽃의 생산 가능성을 증대시킬 수 있게 된다. 또한 영양학적인 측면에서 이미 중요한 생리적 기능이 밝혀진 catechin을 비롯한 proanthocyanidin 과 anthocyanin은 의약품 및 식품첨가제 등 다양한 분야에서 크게 시장성을 넓히고 있어 상업적 측면에서 대사공학의 유망한 목표가 되고 있다. 최근의 대사공학 분야에서의 많은 성공에도 불구하고, flavonoid에 대한 고도의 대사공학 조절을 이용하여 원하는 flavonoid 화합물을 생성하거나, 원치 않는 flavonoid 화합물을 억제하도록 하는 데는 여전히 기술적 문제점들이 남아있다. 예를 들면 IFS와 FLS 등의 유전자 분리 그리고 조직 및 시기 특이적인 promotor 개발 등이 동시에 이루어져야 하며, co-pigmentation 및 액포 pH와 관련된 메카니즘에 대한 이해, 화훼작물들의 형질전환 기술 개발 등이 이루어져야 원하는 꽃의 착색 조절이 가능하게 될 것이다. 최근 나팔꽃에서 액포의 Na⁺H⁺ exchanger를 파괴하여 화색을 변경시킨 mutants 연구를 통하여 조만간 액포 pH의 조절을 이용한 식물 대사공학이 가능할 것으로 기대되고 있다 (Yamaguchi et al. 2001). 아직 자연계에서 기본적인 골격의 변경만으로 수천 종류의 flavonoid가 생성 가능한가는 여전히 의문점으로 남아 있으나, 분명한 것은 다양한 식물 체계에서의 노력으로 농업, 원예, 그리고 영양분 증대를 위한 flavonoid 대사를 어떻게 조절할 것인가에 대한 정보를 얻을 수 있고, 또한 flavonoid 생합성 연구로부터 얻어진 정보들을 통하여 세포질 대사와 기본적인 생물학적 현상에 대한 이해를 넓힐 수 있게 될 것이다.

인용문헌

- Akashi R, Fukuchimizutani M, Aoki T, Ueyama Y, Ayabe S (1999) Molecular cloning and biochemical characterization of novel cytochrome P450, flavone synthase II, that catalyses direct conversion of flavanones to flavones. *Plant Cell Physiol* 40:1182-1186
- Beld M, Martin C, Huits H, Stuithe AR, Gerats AGM (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: Partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol Biol* 13:491-502
- Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulatory of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12:2383-2393
- Britsch L, Ruhnau-Brich B, Forkmann G (1992) Molecular cloning,

- sequence analysis, and in vitro expression of flavanone 3 beta-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *J Biol Chem* **267**:5380-5387
- Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA, Mason JG** (1999) Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*. **19**:441-451
- Brugliera F, Tuill D, Holton TA, Karan M, Treloar N, Simpson K, Skurozynska J, Nason JG** (2000) Introduction of a cytochrome b5 enhances the activity of flavonoid 3'5' (cytochrome P450) in transgenic carnation. Sixth International Congress of Plant Molecular Biology. University of Laval, Quebec, pp 6-8
- Coen EC, Carpenter R, Martin C** (1986) Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum Majus*. *Cell* **47**:285-296
- Cone KC, Burr FA, Burr B** (1986) Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:9631-9635
- Damiani F, Paolocci F, Cluster P, Arcioni S, Tanner G, Joseph R, Li Y, de Majnik J, Larkin P** (1999) The maize transcription factor *Sn* alters proanthocyanidin synthesis in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Aust J Plant Physiol* **26**:159-169
- Davies K, Bloor S, Spiller G** (1998) Production of yellow colour in flower: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*. *Plant J* **13**:259-266
- de Vetten N, ter Horst J, van Schaik J-P, de Boer A, Mol J, Koes R** (1999) A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3'5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:778-783
- de Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, Koes R** (1997) The *an11* locus controlling flower pigmentation in *petunia* encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals. *Genes Dev* **11**:1422-1434
- de Vos R, Bovy A, Busink H, Muir S, Collins G, Verhoeven M** (2000) Improving health potential of crop plants by means of flavonoid pathway engineering. *Polyphenols Commun* **1**:25-26
- Debeaujon I, Peeters AJM, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M** (2001) The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* **13**: 853-871
- Devic M, Guilleminot J, Debeaujon I, Bechtold N, Bensaude E, Koornneef M, Pelletier G, Delseny M** (1999) The BANTULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J* **19**:387-398
- Dixon RA** (1999) Isoflavonoid: biochemistry, molecular biology, and biological functions, in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 1). (Sankawa, U. ed) pp 773-823
- Dixon RA, Steele CL** (1999) Flavonoids and isoflavonoid - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* **4**:394-400
- Dooner HK, Robbins TP, Jorgensen RA** (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu Rev Genet* **25**:173-199
- Dooner HK, Weck E, Adams S, Ralston E, Favreau M, English J** (1985) A molecular genetic analysis of insertions in the *bronze* locus in maize. *Mol Gen Genet* **200**:240-246
- Elomaa P, Holton T** (1994) Modification of flower colour using genetic engineering. *Biotechnol Eng Rev* **12**:63-88
- Federoff NV, Furtek DB, Nelson OE** (1984) Cloning of the *bronze* locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable element *Activator*. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:3825-3829
- Forkmann G, Martens S** (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr Opin in Biotech* **12**:155-160
- Forkmann G, Ruhbau B** (1987) Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. *Z Naturforsch C* **42**:1146-1148
- Goodrich J, Carpenter R, Coen ES** (1992) A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. *Cell* **68**:955-964
- Holton TA, Brugliera F, Lester DR, Tanaka Y, Hyland CD, Melting JGT, Lu C-Y, Farcy E, Stevenson TW, Cornish EC** (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* **366**:276-279
- Holton TA, Cornish EC** (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**:1071-1083
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR** (2002) TRANSPARENT TESTA GLABTA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* **14**:1359-1375
- Jung W, Yu O, Lau S, Keefe D, Odell J, Fader G, Mc Gonigle B** (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat Biotechnol* **18**:208-212
- Koes R, De Vetten N, Mol J** (2000) Cytochrome *b5* form *Petunia*. PCT-international Patent Application No. WO 00/09720.
- Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E, Kuhn DN, Hahlbrock K** (1983) UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:2591-2593
- Larson, RL and Bussard JB** (1986) Microsomal flavonoid 3'-monooxygenase from maize seedlings. *Plant Physiol* **86**:483-486
- Lechelt C, Peterson T, Laird A, Chen J, Dellaporta SL, Dennis E, Peacock WJ, Starlinger P** (1989) Isolation and molecular analysis of the maize P locus. *Mol Gen Genet* **219**:225-234
- Ludwig SR, Habera LF, Dellaporta SL, Wessler SR** (1989) Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:7092-7096
- Martens S, Forkmann G** (1999) Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* hybrids. *Plant J* **20**:611-618
- Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E** (1991)

- Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J* **1**:37-49
- Mehdy MC, Lamb CJ** (1987) Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *EMBO J* **6**:1527-1533
- Menssen A, Hohmann S, Martin W, Schnable PS, Peterson PA, Saedler H, Gierl A** (1990) The En/Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the termini generating a novel intron from a *dSpm* element in the A2 gene. *EMBO J* **9**:3051-3057
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H** (1987) A new *Petunia* flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**:667-678
- Mol J, Grotewold E, Koes R** (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci* **3**:212-217
- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, De Vos CHR, van Tunen AJ, Verhoeven ME** (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nat Biotechnol* **19**:470-474
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L** (2000) The *T78* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell* **12**:1863-1878
- Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Souer E, de Vetter N, Mol J, Koes R** (1999) Molecular analysis of the *anthocyanin 2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* **11**:1433-1444
- Reddy AR, Britsch L, Salamini F, Saedler H, Rohde W** (1987) The A1 (Anthocyanin-1) locus in *Zea mays* encodes dihydroquercetin reductase. *Plant Sci* **52**:7-13
- Robbins M, Bavage A, Strudwicke C, Morris P** (1998) Genetic manipulation of condensed tannins in higher plants. *Plant Physiol* **116**:1133-1144
- Setchell K** (1998) Phytoestrogens: The biochemistry, physiology and implication for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* **68**:1333S-1346S
- Setchell K, Cassidy A** (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nut* **129**:758S-767S
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JNM, Koes R** (2000) Anthocyanin 1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**:1619-1631
- Steele CL, Gijzen M, Qutob D, Dixon RA** (1999) Molecular characterization of the enzyme catalyzing the acyl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Arch Biochem Biophys* **367**:146-150
- Stich K, Eidenberger T, Wurst F, Forkmann G** (1992) Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Planta* **187**:103-108
- Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T** (1998) Metabolic engineering to modify flower colour. *Plant Cell Physiol* **39**:1119-1126
- Vainstein A, Zuker A, Ovadis M** (2000) Transgenic plants and method for transforming carnations. PCT-International Patent Application No. WO 00/50613.
- van Tunen AJ, Hartman SA, Mur LA, Mol JNM** (1989) Regulation of chalcone isomerase (CHI) gene expression in *Petunia hybrida*. The use of alternative promoters in corolla, anthers and pollen. *Plant Mol Biol* **12**:539-551
- van Tunen AJ, Koes RE, Spelt CE, van der Krol AR, Stuitje AR, Mol JNM** (1988) Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: Coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *EMBO J* **4**:1257-1263
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC** (1999) The *TRANSPARENT TESTA GLABRA 1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**:1337-1350
- Weisshaar B, Armstrong GA, Block A, da Costa e Silva O, Hahlbrock K** (1991) Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J* **10**:1777-1786
- Winkel-Shirley B** (2001) Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* **126**:485-493
- Yu O, Jung W, Shi J, Croes RA, Fader GM, McGonigle B, Odell JT** (2000) Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol* **124**:781-793