

β -Carotene Hydroxylase 관련 *Chyb* 유전자를 이용한 형질전환 *Arabidopsis*에서 Astaxanthin의 생합성

이호재^{1*}, 강권규²

¹동의공업대학 식품생명과학과, ²한경대학교 원예학과

Astaxanthin Biosynthesis in Transgenic *Arabidopsis* by Using *Chyb* Gene Encoding β -Carotene Hydroxylase

Ho Jae Lee^{1*}, Kwon Kyoo Kang²

¹Department of Food and Biotechnology, Donggeui Institute of Technology, Pusan 614-715, Korea

²Department of Horticulture, Hankyong National University, Anseong City, Gyeonggi-do 456-749, Korea

ABSTRACT Oxycarotenoids are oxygenated carotenoids that perform critical roles in plants. β -Carotene hydroxylase adds hydroxyl groups to the β -rings of carotenes and has been cloned from several bacteria and plants including *Arabidopsis*. This study was carried out to investigate the effect of β -carotene hydroxylase gene (*Chyb*) on the oxycarotenoids biosynthesis in the transgenic *Arabidopsis*. Construct of pGCHYB containing *Chyb* was established onto Gateway vector system (pENTR3C gateway vector and pH2GW7 destination vector). *Arabidopsis thaliana* (cv. Columbia) was transformed with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 harboring pGCHYB construct driven by 35S promoter and hygromycin resistant gene. Seven hundred bases paired PCR products, indicating the presence of *Chyb* gene, were found in the transformants by PCR analysis using *Chyb* primers. Hygromycin resistance assay showed that transgenes were stably inherited to next generation. The overexpression of the *Chyb* gene resulted in the decrease carotenoid content. Especially, astaxanthin unusual oxycarotenoid in wild type *Arabidopsis* was detected in the transgenic plants. This means that decreased carotenoids might be converted into astaxanthin metabolism with the aid of silent gene in the host.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, astaxanthin, β -carotene hydroxylase, oxycarotenoid

서 론

Carotenoids는 녹색식물, 곰팡이, 효모, 버섯 및 세균 등이 만들어 내는 황색, 적색 또는 자색의 polyene계 색소로서 β -carotene 및 lycopene 등과 같이 분자내에 산소를 함유하지 않고 hydrocarbon만을 포함하는 구조를 지닌 carotene과 lutein, zeaxanthin, violaxanthin 등과 같이 분자내에 산소를 함유하는 xanthophylls (일명 oxycarotenoids)로 대별된다. 식물체에서 carotenoids 생합성의 첫 단계는 geranyl pyrophosphate의 축합에 의하여 phytoene이 생합성 되

는 단계로서 phytoene synthase가 관여한다. 이후 4단계의 후속 desaturation 단계에 2개의 효소 (phytoene desaturase, ζ -carotene desaturase)가 관여되어 lycopene이 형성되며 이후 cyclization 및 oxygen group이 첨가되어 oxycarotenoids가 생합성 된다 (Ladygin 2000; Hirschberg 2001). Carotenoids hydroxylase는 xanthophyll cycle carotenoids 및 lutein, astaxanthin 등을 생성하는데 필수적인 효소이다 (Steinbrenner and Linden 2001; Gotz et al. 2002). 이들 효소는 non-heme di-iron protein으로 활성은 ferredoxine oxido reductase의 작용을 필요로 하는것으로 알려져 있다 (Bouvier et al. 1998). 특히 *Arabidopsis*에는 2개의 β -hydroxylase와 ϵ -hydroxylase 유전자가 분리되어, 이중 β -hydroxylase는 β -ring에 대한 특이성이 매우 강하며 ϵ -ring에 대해서는

*Corresponding author Tel 051-860-3170 Fax 051-860-3331

E-mail hjlee@dit.ac.kr

활성이 매우 낮은 것으로 보고 되었다 (Sun et al. 1996; Tian and DellaPenna 2001; Tian et al. 2003). 또한 β -hydroxylase 1은 β -ring의 hydroxylation에 주 역할을 하는 것으로 추정되고 있으나 (Davison et al. 2002), β -hydroxylase 2에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다. Oxycarotenoids의 생합성 경로상에 존재하는 β -carotene hydroxylase는 lutein과 zeaxanthin의 합성에 중요한 enzyme으로 알려져 있다 (Gotz et al. 2002).

음식물의 형태로 섭취된 carotenoids는 동물체내에서 공액 이중결합이 중복된 장쇄상의 구조에 의해 생체에 유해한 것으로 알려진 singlet oxygen의 소거와 free radical 반응의 억제 기작에 의해 세포와 조직을 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Gann et al. 1999; Giovannucci 1999). 특히 oxy-carotenoids의 일종인 lutein, zeaxanthin의 경우 피부 발암, 유방암 생장을 억제하고 림프구의 증식을 촉진시키며 (Mares-Perlman et al. 2002) 안구의 macular 색소의 성분으로서 나이가 들면서 나타나는 macular degeneration 예방에 관여된다 (Curran-Celentano et al. 2001; Bone et al. 2003; Gale et al. 2003). Astaxanthin 및 fucoxanthin 등은 폐암, 구강암, 신경 세포암 등과 같은 각종 암과 종양에 대하여 강력한 억제물질로서 보고된 바 있다 (Kotake-Nara et al. 2001; Nishino et al. 2002). 최근들어 carotenoids의 성분 및 함량을 개선하기 위해 *E. coli* 및 yeast 등을 이용한 연구가 다양하게 진행되고 있다 (Miura et al. 1998; Sandmann 2002; Gallagher et al. 2003). 또한 식물체에서도 carotenoid 관련 유전자들의 대사제어에 의해 유용한 carotenoids의 생합성에 대한 연구는 daffodil의 phytoene synthase와 lycopene cyclase를 rice에 형질전환하여 rice에 생성되지 않는 다량의 β -carotene을 생성시키는 데 성공한 이른바 golden rice (Giuliano et al. 2000)와 canola seed에 형질전환시켜 300배 이상의 β -caroten 생성량을 증가시킨 golden canola (Shewmaker et al. 1999) 등이 있다.

본 연구에서는 oxycarotenoid의 생합성 경로상에 존재하는 β -hydroxylase 2 gene (*Chyb*)를 *Arabidopsis thaliana*에 형질전환하여 wild type *Arabidopsis*에서는 생합성되지 않는 astaxanthin을 생합성 하였다. Astaxanthin은 일부 조류 및 yeast에서 생합성 된다고 보고된 oxycarotenoid로 식물에서의 생합성은 보고된 바 없다. 따라서 형질전환 *Arabidopsis*에서 생합성된 astaxanthin의 생합성 기작에 대하여 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

Plant materials

A. thaliana (cv. Columbia) 종자를 70% 에탄올로 30초간 표면 살균한 후, 몇방울의 Tween 20액을 혼합시킨

3% 차염소산나트륨 (NaOCl) 용액에 20분간 침지 소독한 후, 멸균수로 6-7회 수세하여 sucrose 3%, agar 0.8%가 첨가된 MS (Murashige and Sckoog 1962) 고체배지에 치상하였다. 발아는 27°C, 16 h light/ 8 h dark의 조건하에서 실시하였다.

유전자 및 형질전환용 vector 구축

β -carotene hydroxylase관련된 *Chyb*유전자는 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)에서 보관하고 있는 gene accession No. AY117225를 plasmid 형태로 분양받아 사용하였다. 형질전환에 있어서 binary vector는 Gateway™ vector system을 사용하였다. 이때 entry vector는 pENTR™3C vector (Invitrogen, CA, USA), destination vector는 pH2GW7 vector (VIB/Ghent Univ., Belgium)를 각각 사용하였다. 재조합한 Ti-plasmid를 electroporation method에 의해 *A. tumefaciens* GV3101에 도입하였다. Electroporation은 Electro Cell Manipulator®600 (BTX INC, CA, USA)을 이용하여 1.7 KV, 5 msec 조건으로 실시하였다. 공시균주의 배양은 50 mg/L hygromycin이 첨가된 LB 액체배지에 접종한 후, 48시간동안 28°C에서 배양하였다.

형질전환

*Arabidopsis*의 형질전환은 Clough와 Bent (1998)의 방법에 준하여 실시하였다. 재조합된 pGCHYB를 포함하는 *A. tumefaciens* GV3101배양액에 *Arabidopsis* 꽃봉오리를 거꾸로 담가 형질전환을 유도한 후, 종자를 수확하였다. 형질전환 개체를 선발하기 위하여 수확한 종자를 hygromycin 10, 20, 30, 40 및 50 mg/L와 carbenicillin 50, 100, 200 및 400 mg/L이 각각 첨가된 배지에서 선발의 최적조건을 정하였다. 선발된 개체는 인조 흙 (metro Mix 200, Hummert seed Co., USA)에 이식하여 생장시켰으며, 앞으로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR (polymerase chain reaction) 분석을 실시하였다.

RT-PCR

Total RNA 10 μ g을 template로 하여 first-strand cDNA는 SuperScript™ II (Invitrogen, USA)를 이용하여 합성하였다. Second strand amplification은 *Chyb* primer, Taq polymerase (NEB)을 이용하여 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer Applied Biosystem, USA)에서 통상의 방법으로 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 하여 30 cycle polymerization하고 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 연장시키도록 하였다. 최종

PCR 산물은 1% agarose gel상에서 ethidium bromide 염색을 하여 확인하였다.

Carotenoid의 추출 및 분석

동결건조하여 분쇄한 *Arabidopsis* 시료 1-2 mg을 정확히 취하여 100 μ L methanol에 넣어 4°C에서 5분 동안 진탕한 후, Tris-HCl (50 mM Tris and 1 M NaCl, pH 7.5)을 첨가하여 10분 동안 진탕 추출하였다. 그 후, chloroform 400 μ L를 첨가하여 10분 동안 진탕한 후 5000 \times g로 5분간 원심 분리하여 하층부를 조심스럽게 취하였다. 상층부는 다시 400 μ L의 chloroform으로 3회 반복 추출하여 하층부를 취해 처음 분리한 부분과 섞어 질소가스를 붙여 넣어 용매를 날려 보낸 후 시료로 사용하였다.

시료는 ethylacetate 5 mL로 녹여 0.45 μ m millipore filter로 여과한 후 50 μ L을 HPLC (Waters 2695 system, USA)에 주입하여 carotenoid 함량을 분석하였다. 이때 분석은 C30 column (YMCTM S3, Waters, 250 \times 4.6 mm)에서 3가지 용매 (A: methanol, B: 2% ammonium acetate가 함유된 80% methanol, C: methyl tert buthyl ether)의 용매 구배 조건으로 실시하여 PDA detector (W996)로 460 nm에서 carotenoid를 검출하였다. 용매의 구배조건은 95% A, 5% B로 12분간 유지한 후, 80% A, 5% B, 15% C 변경시켜 30분간 유지하고 30% A, 5% B, 65% C로 변경시켜 70분간 유지시켰다. Carotenoids 표준품의 retention time과 chromatogram을 비교하여 carotenoids를 확인한 후, peak 면적과 extinction value를 이용하여 정량 분석하였다.

결과 및 고찰

Chyb 유전자의 Ti-plasmid vector구축

Carotene으로부터 oxycarotenoids의 합성과정에서는 C-4 oxygenase와 β -carotene hydroxylase 등이 관여하게 되는데 특히 lutein과 zeaxanthin의 합성과정에 있어서 hydroxyl group의 도입을 위하여 β -carotene hydroxylase가 필수적

이다 (Gotz et al. 2002). *Arabidopsis*에는 2종의 β -hydroxylase가 보고된 바가 있다(Davison et al. 2002). 본 실험에 사용된 β -hydroxylase 2 gene (*Chyb*)는 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)에서 보관하고 있는 gene accession No. AY117225를 plasmid 형태로 분양받아 EcoRI/NotI을 처리하고 전기영동하여 709 kb의 크기 절편을 분리하여 pENTRTM3C vector (Invitrogen, CA, USA)의 EcoRI/NotI site에 cloning하였다. 또한 T-DNA를 포함하는 부위는 (LR-Clonase) destination vector, pH2GW7 vector (VIB/Ghent Univ., Belgium)에 옮겨 형질전환용 Ti-plasmid vector를 구축하여 pGCHYB vector로 명명하였다. 재조합한 pGCHYB의 확인은 restriction enzyme site 및 *Chyb* 유전자의 염기배열 분석을 통해 sense 방향을 확인하였다. 선발 marker는 Spectinomycin^R 및 Hygromycin^R으로 *Chyb* 유전자는 35S promoter에 의해 조절되도록 구축하였다 (Figure 1).

형질전환체 선발

Clough와 Bent (1998)의 방법에 의해 형질전환시켜 얻은 종자는 hygromycin 및 carbenicillin이 첨가된 MS 배지에서 선발하였다. Wild type *Arabidopsis*는 30 ppm 이상의 hygromycin 배지에서 발아 후 모두 고사하였다. 그러나 형질전환시켜 얻은 종자는 hygromycin 50 ppm에서 생장한 개체를 선발할 수 있었다. 이러한 결과는 tobacco plant의 경우 30-50 ppm (Kim et al. 1993)과 매우 유사한 결과로서 chinese cabbage의 5 ppm (Kang and Park 2001)보다 hygromycin에 대한 높은 내성을 보이는 것으로 나타났다. 형질전환체에서 *Agrobacterium*을 제거하기 위해 사용된 carbenicillin은 일부 식물 세포의 생육 및 재분화에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있으나 (Kang and Park 2001), 본 실험에 사용된 50-400 ppm의 농도에서 *A. thaliana*의 발아 및 생육에 전혀 영향을 주지 않았다. Hygromycin 50 ppm과 carbenicillin 400 ppm이 포함된 MS배지에서 생육한 식물체는 정상형 식물체와 비교하여 다소 왜소하였고 잎의 색은 비교적 밝은 황색을 나타냈다 (Figure 2).

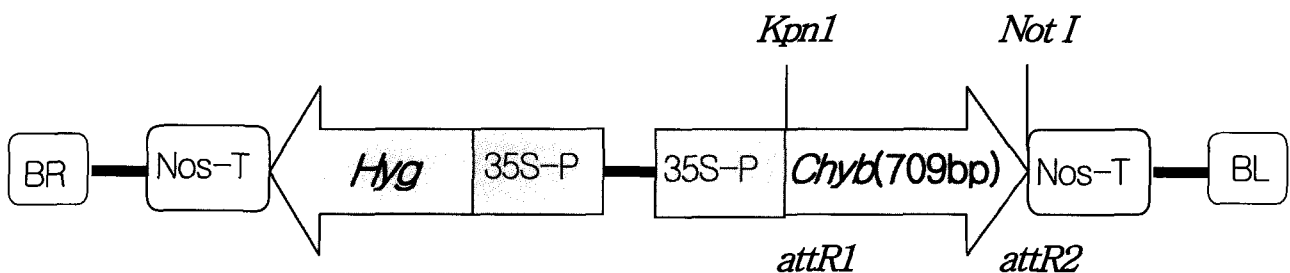


Figure 1. The T-DNA region of the binary vector pGCHYB containing the : hygromycin resistance gene (*Hyg*), 35S promoter, and β -hydroxylase gene (*Chyb*) gene. *attR1* and *attR2*; recombination site of GatewayTM vector.



Figure 2. The transgenic *A. thaliana* containing recombinant DNA in pGCHYB.

PCR 분석에 의한 도입 유전자의 발현확인

선발된 식물체들에 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여, *Chyb* 유전자 특이 forward primer (5'-TTCTC CGCAAACCACCACCCTATA-3')와 reverse primer (5'-CCAACTCTTCTTTTCCCTCCCACTTC-3')를 이용하여 PCR 분석한 결과 wild type에서는 증폭되지 않았으나 선발된 식물체에서는 709 bp 증폭산물을 얻을 수 있었다 (Figure 3a). 도입이 확인된 형질전환체의 앞에서 *Chyb* 유전자가 안정적으로 발현되고 있는지를 확인하기 위해 RT-PCR 분석한 결과 wild type에서는 *Chyb* 유전자가 증폭산물을 얻지 못하

였으나, 형질전환체에서는 709 bp의 증폭산물을 확인 할 수 있었다 (Figure 3b). 따라서 *Chyb* 유전자가 *A. thaliana*의 genome내에 안정적으로 도입되어, 35S promoter의 조절하에 발현되고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

형질전환체에서 oxycarotenoids인 astaxanthin 합성

이으로부터 carotenoids를 추출하여 HPLC 분석한 결과 형질전환체에서 xanthophyll cycle carotenoids인 violaxanthin과 zeaxanthin의 함량이 wild type과 비교할 때 상당량 감소하였고 β -carotene 함량도 감소하였다 (Table 1). Davison 등은 β -hydroxylase 유전자를 *Arabidopsis*에 형질 전환시킨 결과 2배 정도의 xanthophyll cycle carotenoids pool이 증가되었으며, 이로 인해 heat stress에 내성이 증가하였다고

Table 1. Contents of carotenoids produced in non transformed and transformed *A. thaliana*

Components	RT (min)	Contents (nmol/g DW)	
		Non transformant	Transformant
Neoxanthin	9.92	138.1	40.3
Violaxanthin	12.00	246.9	217.6
Astaxanthin	18.21	0	19.1
Lutein	19.40	1828.9	1456.4
Zeaxanthin	26.76	172.2	79.2
β -Carotene	28.92	514.6	207.2
cis- β -Carotene	29.63	104.3	34.9

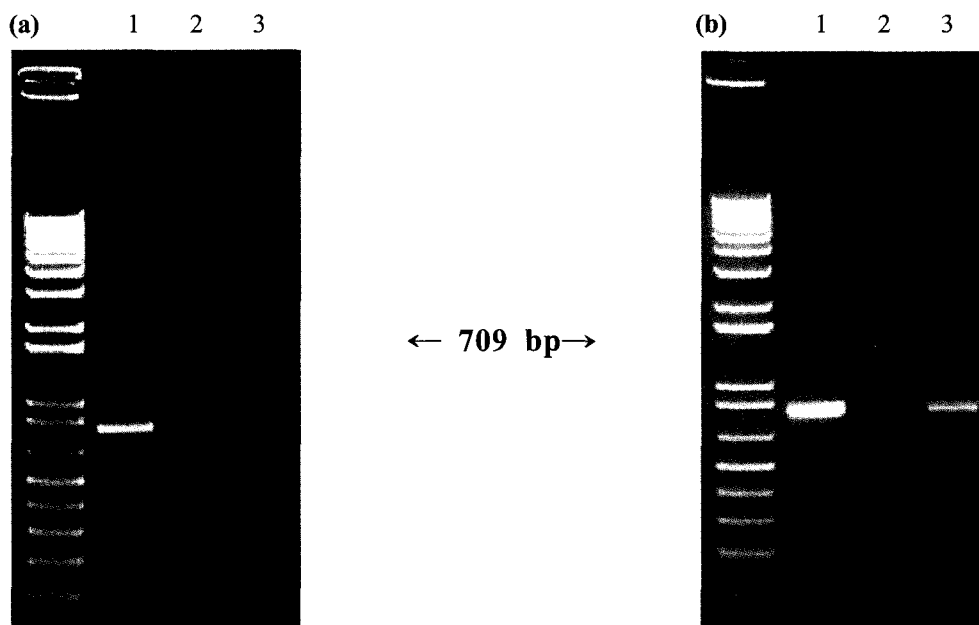


Figure 3. PCR analysis of genomic DNA extracted from *A. thaliana* (a) Lane1; positive control (β -hydroxylase gene (*Chyb*), Lane 2; transgenic plant, Lane 3; wild type. RT-PCR analysis of RNA extracted from *A. thaliana* (b) Lane1; positive control (β -hydroxylase gene (*Chyb*), Lane 2; wild type, Lane 3; transgenic plant.

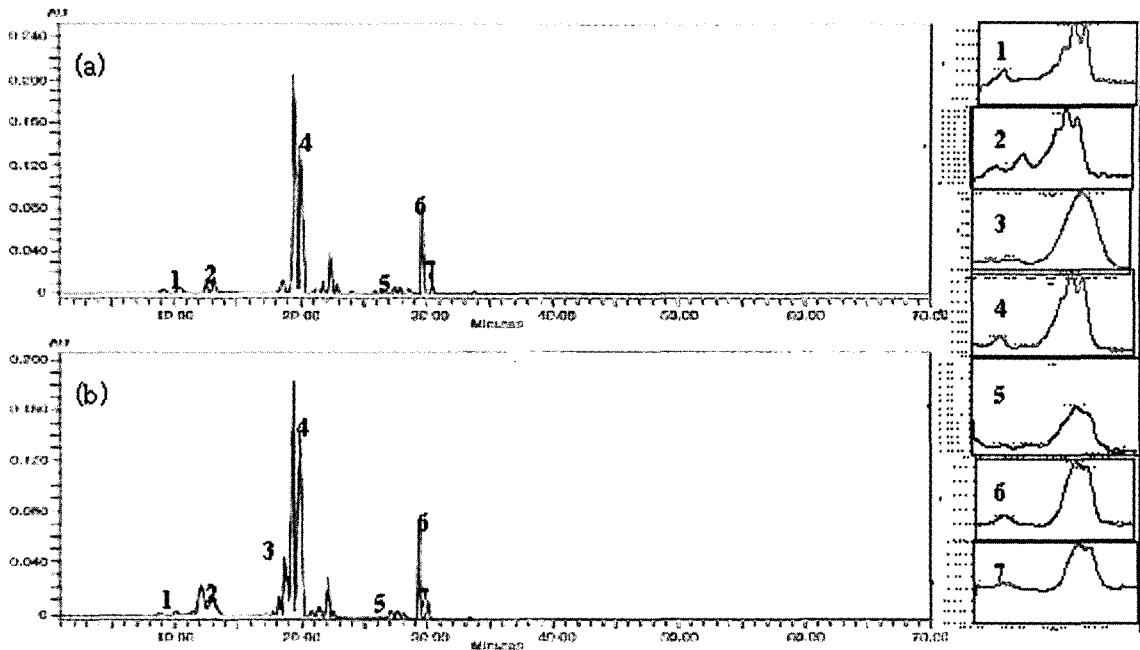


Figure 4. HPLC chromatograms recorded at 460nm of wild type (a) and transformant (b) of *A. thaliana*. The peaks are (1) neoxanthin; (2) violaxanthin; (3) astaxanthin; (4) lutein; (5) zeaxanthin; (6) β -carotene; (7) cis- β -carotene.

보고한 바 있다 (Davison et al. 2002). 그러나 본 연구에서는 이와 상반되는 결과를 보였으며, 특이하게 astaxanthin이 생합성 되었다 (Figure 4b). Fraser 등은 *Arabidopsis* wild type에서는 astaxanthin을 생합성되지 않는다고 하였다 (Fraser et al. 2000). 본 실험의 wild type에서도 Fraser 등의 결과와 일치되었다 (Figure 4a). 따라서 *Chyb* 유전자가 도입된 형질전환체에서 astaxanthin의 생합성은 매우 고무적인 결과라고 할 수 있다. 일반적으로 β -carotene으로부터 astaxanthin이 생성되려면 β -hydroxylase와 C-4-oxygenase의 작용이 필요한 것으로 알려져 있다. *Haematococcus*의 C-4-oxygenase 및 *bkt* 유전자를 *E. coli*에 도입하여 astaxanthin이 형성된 보고가 있으며 (Lotan and Hirschberg 1995; Breitenbach et al. 1996), 식물체에서는 *Haematococcus CrtO* 유전자를 이용한 형질전환 담배 (Mann et al. 2000), *Cyanobacteria CrtO* 유전자를 이용한 형질전환 *Synechococcus* (Harker and Hirschberg 1997)에서 astaxanthin이 생성된 바 있다. 이러한 결과 들은 host에 기 존재하는 C-4-oxygenase 또는 β -hydroxylase와 형질전환체에 도입된 유전자의 작용으로 hydroxylation과 ketolation 작용이 진행된 결과라 할 수 있다. 그러나 *Arabidopsis*에는 C-4-oxygenase의 존재가 보고된 바 없으므로 β -hydroxylase 유전자에 의해 lutein 또는 zeaxanthin이 아닌 astaxanthin이 생성된 것은 의외의 결과라 할 수 있다. 형질전환 *Arabidopsis*에서 astaxanthin의 생합성은 첫째 β -hydroxylase의 over expression에 의하여 축적된 중간대사산물에 의하여 C-4 -oxygenase 기능이 활성화되었거나, 둘째 *Chyb* 유전자가 C-4-oxygenase의 기능을 함께 지니고 있기 때문이라고 생각되어진다. 실제로

Haematococcus 등에서는 hydroxylase gene은 ketolase 기능을 공유하고 있는 경우가 있다 (Lotan and Hirschberg 1995; Breitenbach et al. 1996). 그러나 이러한 것은 중간 대사물질의 표지, 관여된 transcript 및 metabolite 분석에 등을 통한 대사제어 연구를 통하여 자세히 규명되어져야 할 것이다.

적 요

Oxycarotenoids는 녹색식물, 곰팡이, 효모, 버섯 및 세균 등이 만들어 내는 황색, 적색 또는 자색의 polyene계 색소로 분자내에 산소를 함유하며 생체내에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 본 실험에서는 Oxycarotenoids의 생합성 경로상에 존재하는 β -carotene hydroxylase 유전자 (*Chyb*)가 재조합된 Ti-plasmid (pGCHYB)를 *A. tumefaciens* GV3101에 의해 *Arabidopsis thaliana* (cv. Columbia)에 형질전환하였다. 50 mg/L hygromycin 함유한 MS 배지에서 선발된 개체를 이용하여 *Chyb* 유전자의 도입여부를 PCR로 분석한 결과, 대조구에서는 *Chyb* 유전자의 증폭되지 않았으나 형질전환체에서는 증폭 산물을 확인 할 수 있었다. 또한 형질전환체의 발현여부를 RT-PCR분석한 결과 도입된 *Chyb* 유전자가 안정적으로 발현되었다. 형질전환체의 carotenoids를 HPLC 분석한 결과 xanthophyll cycle carotenoids (violaxanthin과 zeaxanthin)의 함량 및 β -carotene 함량은 감소 되었으며, 대조구 *Arabidopsis*에는 생합성되지 않는 astaxanthin이 생합성되었다. 따라서 본 실험에서 육성된 형질전환체를 이용하여 oxycarotenoids 생

합성 과정상의 중간대사물질의 표지, 관여된 transcript 및 metabolite 분석 등을 통해 carotenoids 대사계의 연구소재로 활용 할 수 있을 것으로 기대한다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 해외 Post-doc. 연수지원에 의하여 수행되었음.

인용문헌

- Bone RA, Landrum JT, Guerra LH, Ruiz CA (2003) Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. *J Nutr* 133: 992-998
- Bouvier F, Keller Y, d'Harlingue A, Camara B (1998) Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum L.*). *Biochim Biophys Acta* 1391: 320-328
- Breitenbach J, Misawa N, Kajiwara S, Sandmann G (1996) Expression in *Escherichia coli* and properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis*. *FEMS Microbiol Lett* 140: 241-246
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743
- Curran-Celentano J, Hammond BR, Jr., Ciulla TA, Cooper DA, Pratt LM, Danis RB (2001) Relation between dietary intake, serum concentrations, and retinal concentrations of lutein and zeaxanthin in adults in a Midwest population. *Am J Clin Nutr* 74: 796-802
- Davison PA, Hunter CN, Horton P (2002) Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 418: 203-2066
- Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE, Bramley PM (2000) Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J* 24: 551-558
- Gale CR, Hall NF, Phillips DI, Martyn CN (2003) Lutein and zeaxanthin status and risk of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 2461-2465
- Gallagher CE, Cervantes-Cervantes M, Wurtzel ET (2003) Surrogate biochemistry: use of *Escherichia coli* to identify plant cDNAs that impact metabolic engineering of carotenoid accumulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 713-719
- Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens CH, Stampfer MJ (1999) Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* 59: 1225-1230
- Giovannucci E (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* 91: 317-331
- Giuliano G, Aquilani R, Dharmapuri S (2000) Metabolic engineering of plant carotenoids. *Trends Plant Sci* 5: 406-409
- Gotz T, Sandmann G, Romer S (2002) Expression of a bacterial carotene hydroxylase gene (crtZ) enhances UV tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol* 50: 129-142
- Harker M, Hirschberg J (1997) Biosynthesis of ketocarotenoids in transgenic cyanobacteria expressing the algal gene for beta-C-4-oxygenase, crtO. *FEBS Lett* 404: 129-134
- Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4: 210-218
- Kang B, Park Y (2001) Effect of antibiotics and herbicide on shoot regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of chinese cabbage. *Kor J Hort Sci Technol* 19: 17-21
- Kim Y, Soh W, Suh M, Hong C (1993) Transformation of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) for Hygromycin-resistance. *Korean J. Plant Tiss Cult* 20: 103-107
- Kotake-Nara E, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita K, Nagao A (2001) Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J Nutr* 131: 3303-3306
- Ladygin VG (2000) Biosynthesis of carotenoids in plastids of plants. *Biochemistry (Mosc)* 65: 1113-1128
- Lotan T, Hirschberg J (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding beta-C-4-oxygenase, that converts beta-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett* 364: 125-128
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol* 18: 888-892
- Mares-Periman JA, Millen AE, Ficek TL, Hankinson SE (2002) The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J Nutr* 132: 518S-524S
- Miura Y, Kondo K, Saito T, Shimada H, Fraser PD, Misawa N (1998) Production of the carotenoids lycopene, beta-carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1226-1229
- Murashige T, Sckoog F (1962) A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nishino H, Murakosh M, li T, Takemura M, Kuchide M, Kanazawa M, Mou XY, Wada S, Masuda M, Ohsaka Y, Yogosawa S, Satomi Y, Jinno K (2002) Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 21: 257-264
- Sandmann G (2002) Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: a powerful approach for the biosynthesis of novel structures. *Chembiochem* 3: 629-635
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* 20: 401-412

- Steinbrenner J, Linden H (2001) Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol* 125: 810-817
- 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
- Tian L, DellaPenna D (2001) Characterization of a second carotenoid beta-hydroxylase gene from *Arabidopsis* and its relationship to the LUT1 locus. *Plant Mol Biol* 47: 379-388
- Tian L, Magallanes-Lundback M, Musetti V, DellaPenna D (2003) Functional analysis of beta- and epsilon-ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1320-1332

(접수일자 2004년 6월 22일, 수리일자 2004년 7월 20일)