

## 바이오매스에서 식물지방 생산

김현욱 · 이경렬 · 김은하 · 노경희 · 강찬철 · 김종범

## Production of vegetable oil in biomass

Hyun Uk Kim · Kyeong-Ryeol Lee · Eun-Ha Kim · Kyung Hee Roh · Han Chul Kang · Jong-Bum Kim

Received: 2 September 2014 / Revised: 19 September 2014 / Accepted: 22 September 2014  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Vegetable oils (triacylglycerols) produced mainly in seeds of plants are used for valuable foods that supply essential fatty acids for humans as well as industrial raw materials and biofuel production. As the demanding for vegetable oils has increased, plant metabolic engineering to produce triacylglycerols in biomass such as leaves has been considered and explored for alternative source of vegetable oils. Leaves are genetically programmed to supply the fixed carbon by photosynthesis to other organs for plant development and growth. Therefore, in order to produce and accumulate triacylglycerols in leaves, one should take account of multiple metabolic pathways such as carbon flux, competition of carbohydrate and fatty acid biosynthesis, and triacylglycerols turnover in leaves. The recent metabolic engineering strategy has showed potential in which the co-expression of three genes *WRINKLED1*, *DGAT1*, and *OLEOSIN* involved in the critical step for increasing the fatty acid synthesis, accumulating triacylglycerols, and protecting triacylglycerols, respectively produced higher amount of vegetable oils in leaves. Developing of genetically engineered plants producing vegetable oil in biomass at non-agricultural lands will be promising to the future success of the field.

## 서론

식물 종자의 지방은 인류에게 불포화 지방산을 공급하는 필수 식품(Huffman et al. 2011)인 동시에 자동차 연료인 바이오 디젤과 세제, 윤활유, 제약원료 등 다양한 생필품의 원료이다(Cahoon et al. 2007). 세계 인구의 지속적인 증가와 석유자원의 고갈은 앞으로 지속생산 가능한 석유 대체 산업원료 생산이 필요한데 식물이 녹색 산업원료 생산의 대안이 될 수 있으며, 종자에서 생산되는 고에너지 축적 탄소 물질인 지방이 석유 대체 원료로 사용 가능하다(Durret et al. 2008; Lu et al. 2011).

국제식량농업기구(FAO)의 식물지방 생산에 관한 예측에 의하면 현재의 식품, 자동차 연료, 산업원료의 수요를 고려할 때 앞으로 30년 후에는 현재보다 식물의 지방 생산량을 2배 이상 늘려야 한다(FAO 2003). 하지만 산업화와 기후변화로 인한 재배 농지의 감소와 생산성의 한계는 현재의 농업생산성으로는 극복하기 어려운 상황이다. 그러므로 식물의 지방 생산량을 획기적으로 증대할 수 있는 기술이 필요하다. 그 대안으로 식물의 종자에서만 생산되는 지방을 대사공학기술을 이용하여 바이오매스가 크지만 농업적으로 쓸모 없는 잎과 같은 조직에서 생산하는 연구가 최근에 진행되고 있다. 잎의 주요 탄수화물을 지방으로 전환한다면 세가지 장점이 있다. 첫째, 지방은 탄수화물보다 단위 질량당 에너지 효율이 높다. 둘째, 지방은 식물조직에서 탄수화물보다 작은 부피를 차지하기 때문에 많은 에너지 저장이 가능하다. 셋째는 지방은 추출·정제 과정이 탄수화물보다 간단하여 바이오연료 및 산업원료로 사용이 용이하다.

본 총설에서는 잎의 탄수화물과 지방 합성간의 경쟁적인 탄소 대사와 지방의 합성과 지방 분해에 의한 탄소 재활용 기작의 고찰을 통해 잎에서 지방 생산과 증대에 고려할 사항을 제시하고자 한다. 또한 최근 오믹스 기술을

H. U. Kim (✉) · K.-R. Lee · E.-H. Kim · K. H. Roh · H. C. Kang · J.-B. Kim  
농촌진흥청, 국립농업과학원, 농업생명자원부  
(Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Jeonju 560-500, Republic of Korea)  
e-mail: hukim64@korea.kr

이용하여 탄수화물을 지방으로 전환시키는 인자를 발견하고자 하는 시도와 앞에서 지방을 생산하고자 하는 대사공학 연구 현황을 기술하였다.

## 잎의 탄소대사

잎은 엽록체에서 광합성을 통해 대기중의 이산화탄소를 고정하여 저장조직(sink)인 종자 등에 탄소를 공급(source)하는 조직이다. 낮에 광합성에 의해 고정된 탄소는 대부분 자당(sucrose) 형태로 다른 조직으로 이동하거나 전분(starch) 형태로 잎의 엽록체 안에 저장되며 밤 동안 전분은 자당으로 분해되어 식물생장에 필요한 에너지로 사용된다(Weise et al. 2012; Fettke et al. 2012; Stitt and Zeeman 2012). 잎에서 고정된 탄소의 일부분은 세포막지질을 포함한 세포활성에 필요한 유기물질을 합성하는데 사용된다. 비록 잎은 종자처럼 저장 형태의 지방을 축적하지는 않지만 매우 적은 양의 중성지방(triacylglycerol; TAG)을 합성한다. 이 중성지방은 세포막 지질로 재활용되거나 퍼옥시좀에서 지방산으로 분해되어 미토콘드리아에서 세포호흡에 사용된다(Lin and Oliver 2008; Chapman et al. 2012).

일반적인 식물 잎의 엽육세포에서의 탄수화물과 중성지방 합성과 그 흐름을 모식화하였다(Fig. 1). 세포 내 여러 소기관이 지방의 합성과 분해에 관여한다. 특히 지방 합성 대사는 여러 소기관에 의해 분획화되어 있다. 지방산(fatty acid; FA)은 지방산합성 복합효소에 의해 엽록체 스트로마에서 2개의 탄소를 이용한 중합반응을 통해 탄소가 16 또는 18개인 지방산이 되어 소포체로 이동되어 세포막 지질 또는 중성지방 합성에 사용된다(Ohlrogge and Jaworski 1997). 중성지방은 대부분 소포체에 존재하는 효

소들에 의해 합성이 되어 소포체 막 사이에 모여서 세포질내로 단리되어 지방체(lipid droplet)를 형성한다(Chapman et al. 2012; Murphy 2012). 중성지방은 지방분해효소(lipase)에 의해 지방산으로 분리된 후 소포체에서 세포막 인지질 합성에 재활용되거나 또는 퍼옥시좀으로 이동되어  $\beta$ -oxidation에 의해 분해된다(Graham 2008). 잎의 퍼옥시좀은 최종산물로 구연산(citrate)를 생성하지만 노화된 잎 또는 유묘의 퍼옥시좀에서는 glyoxylate cycle을 거쳐 succinate를 생성하는 차이가 있다(Pracharoenwattana et al. 2005). 특히 노화된 잎에서 이 두 산물은 미토콘드리아에서 TCA Cycle을 거쳐 산화되거나 세포질에서 포도당 신생합성(gluconeogenesis) 과정을 거쳐 자당을 합성하고 다른 조직으로 이동된다(Graham 2008; Troncoso-Ponce et al. 2013).

잎의 탄소대사를 종합해보면 소량의 지방을 합성하여 축적하는 기작은 존재하나 이는 세포활성을 위해 탄소를 재활용하기 위한 최소한의 지방 합성을 유지하며 대부분 탄소를 자당으로 전환하여 탄소를 저장기관에 공급하는 역할을 함을 알 수 있다.

## 엽록체의 탄수화물과 지방대사

엽록체는 빛 에너지를 이용하여 고정된 탄소를 식물의 생장에 이용한다. 이산화탄소 고정은 광인산화반응(photo-phosphorylation)에서 생성된 ATP를 이용하여 캘빈-벤슨(Calvin-Benson) 사이클을 통해 이산화탄소를 화학에너지인 탄수화물로 고정한다. 이산화탄소 3분자 사용으로 3-phosphoglycerate (3-PGA) 1분자를 형성한다. 3-PGA는 triose phosphate (TP)로 환원되어 자당 생산을 위해 세포질로 방출되거나 스트로마 내에서 전분합성에 이용된다. 전분은 밤에 맥아당(maltose)과 포도당(glucose)으로 전환되어 엽

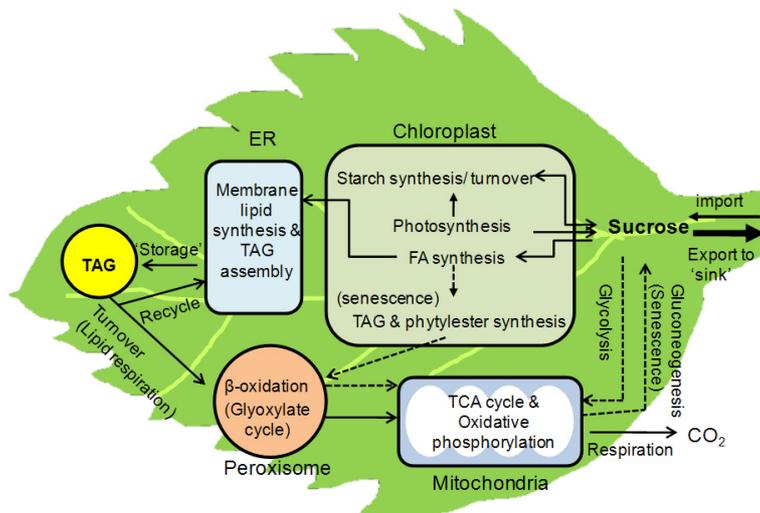


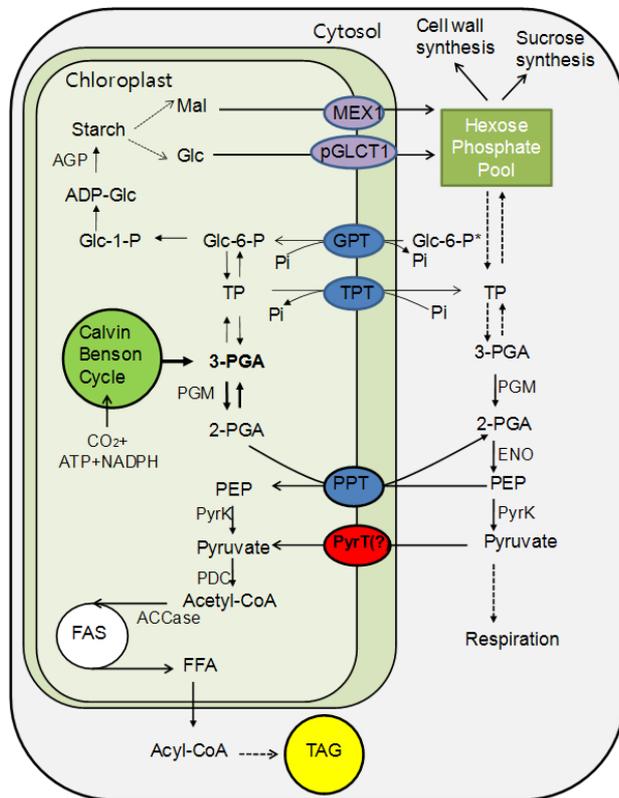
Fig. 1 Overall scheme of carbon flux and lipid metabolism in green leaf

록체로부터 세포질로 이동되어 자당으로 전환된 후 저장 기관으로 이동된다(Fig. 2)

지방산 합성 또한 엽록체 내에서 광합성에 의해 고정된 탄소를 사용하기 때문에 탄수화물 합성과 경쟁 관계에 있다고 할 수 있다. 피루브산(pyruvate)은 지방산합성의 초기전구체인 acetyl-CoA 형성의 주원료이다(Behal et al. 2002; Eastmond and Rawsthorne 2000). 그러므로 엽록체 내에서 피루브산을 acetyl-CoA로 전환시키는 엽록체 pyruvate dehydrogenase와 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 전환시키는 acetyl-CoA carboxylase (ACCase)가 지방산합성의 속도제한반응(rate-limiting) 단계이다(Ohlrogge and Jaworski 1997; Andre et al. 2007). 피루브산은 phosphoenolpyruvate (PEP)로부터 합성되며 주로 세포질에서 엽록체로 이동된다(Weber and Linka 2011). 이러한 이유는 엽록체에는 2-phosphoglycerate (2-PGA)를 phosphoenolpyruvate (PEP)로 전환하는 해당과정

효소인 enolase가 부족하기 때문이며(Prabhakar et al. 2010; Fig. 2), 따라서 피루브산은 엽록체막에 존재할 것으로 추정되는 피루브산수송체를 통해 세포질에서 엽록체로 이동될 수 있다(Furumoto et al. 2011). 엽록체로부터 합성된 탄소길이가 16 또는 18개인 지방산은 소포체로 이동되어 세포막 인지질과 중성지방을 합성한다(Fig. 1, 3). 지방산합성의 속도제한반응 효소인 ACCase의 활성은 지방산합성량에 의해 negative feedback regulation를 받는다. 이를 통해 잎의 세포에서 지방 합성이 제한되어 최적으로 조절됨을 보여 준다(Andre et al. 2012). 식물의 성장과 발달에 각각의 식물기관은 자당을 주요 탄소원료로 사용하며 잎으로부터 공급을 받는다(Fig. 1, 2). 잎은 각 기관 공급에 필요한 탄소 고정량을 설정하며 초과된 탄소는 전분 형태로 저장한 후 밤 동안 사용한다(Fig. 2). 잎에서 지질 합성량은 세포와 조직의 구조에 따른 세포막 형성과 생리활성에 필요한 지질 물질의 수요에 따라 결정된다. 따라서 잎에서는 중성지방합성에 필요한 효소가 존재함에도 불구하고 매우 미량의 중성지방만이 합성된다(Chapman and Ohlrogge 2012; Yang and Ohlrogge 2009). 이는 잎에서 지방합성 및 저장 대사가 주 탄소대사가 아님을 시사한다.

잎의 지방합성 증가 조절을 위해서는 엽록체의 전분합성과 분해에 의한 재활용, 탄수화물과 자당의 합성과 세포질로의 수송, 엽록체의 지방산 합성과 세포질의 지방합성과 분해 과정을 고려해야 한다. 그 예로 지방합성 전사인자인 WRINKLED1 (WRI1)의 발현과 동시에 전분합성에 관여하는 ADP glucose pyrophosphorylase를 RNAi로 억제한 경우 잎에서 중성지방체 형성유도와 중성지방의 합성을 크게 증가시켰다(Sanjaya et al. 2011). 전분과 지방합성간의 탄소의 상호 교환 연구는 종자에서 보고 되었다(Rawsthorne 2002; Andriotis et al. 2012). 종자는 잎으로부터 자당을 공급받아 탄소를 저장하는 기관인 반면, 잎의 경우 종자와는 매우 다른 공급과 저장 체계를 갖추고 있으므로 이러한 관점에서 대사공학 연구가 이루어진다면 잎에서 지방의 합성 및 축적을 향상시킬 수 있을 것이다.



**Fig. 2** Major chloroplast transporters for carbon flow between chloroplast and cytosol. Five major, MEX1, pGLCT1, GPT, TPT, PPT and one unknown PyrT are located in inner membrane of chloroplast. MEX1: maltos excess protein 1-like/maltose exporter, pGLCT1: plastid glucose translocator, GPT: glucose-6-phosphate/phosphate translocator, TPT: triose phosphate translocator, PPT: phosphoenolpyruvate/phosphate translocator, PyrT: pyruvate transporter. Mal: maltose, Glc: glucose, AGP: AGPase, TP: triose phosphate, 3-PGA: 3-phosphoglycerate, 2-PGA: 2-phosphoglycerate, PEP: phosphoenolpyruvate, PyrK: pyruvate kinase, PDC: pyruvate dehydrogenase complex, PGM: phosphoglycerate mutase, ENO: enolase, FAS: fatty acid synthase, ACCase: acetyl-CoA carboxylase, FFA: free fatty acid

### 엽록체의 탄소대사 관련 수송체

엽록체와 세포질은 해당과정과 포도당신생합성 두 대사를 동일하게 가지고 있어서 엽록체에 존재하는 탄소 수송체를 통해 대사체가 상호 이동하여 대사가 이루어진다(Fig. 2). 두 가지 형태의 phosphate translocators (antiporters)가 잎의 탄소대사와 지방산 합성에 관여한다. Triose phosphate translocator (TPT)는 triose phosphate를 세포질로 이동하는 동시에 인산과 3-PGA를 엽록체로 이동시킨다. 이 과정이 대부분의 자당 합성을 조절한다. 엽록체는 PEP를 합성하

는 해당대사 효소가 존재하지 않으므로 PEP를 외부로부터 수용해야만 한다(Prabhakar et al. 2010). Phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT)는 PEP를 엽록체 안으로 수송하며 2-PGA를 세포질로 이동한다. 세포질로부터 유입된 엽록체의 PEP는 지방산 합성에 사용된다(Flugge et al. 2011; Fig. 2).

TPT와 PPT 이외에도 C4식물의 엽록체 내막에 피루브산 수송체가 존재할 것으로 보고되었으며, 모든 육지 식물에 있을 것으로 추정된다(Weber and Linka 2011; Furumoto et al. 2011). 이 피루브산수송체는 엽록체의 지방산 합성에 매우 중요한 역할을 할 것으로 추정되기 때문에 잎의 탄소를 지방으로 전환하는데 고려되어야 할 중요한 수송체이다.

낮에 잎에 축적된 전분은 밤에 맥아당과 포도당으로 분해되어 각각 Maltos excess protein 1-like/maltose exporter (MEX1)와 Plastid glucose translocator (pGLCT) 수송체를 통해 세포질로 방출된다. Glucose-6-phosphate/phosphate translocator (GPT)는 산화적 오탄당 인산(oxidative pentose phosphate) 대사와 종속영양 조직의 전분 합성에 관여한다(Weber and Linka 2011). 오탄당 인산 대사는 몇몇 비녹색 색소체에서 지방산합성에 간접적으로 영향을 준다(Andriotis et al. 2012; Hutchings et al. 2005).

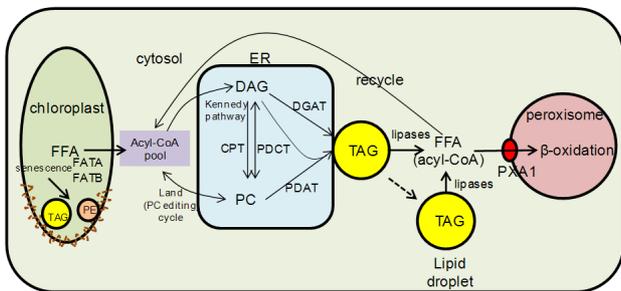
**소포체의 중성지방 합성**

엽록체에서 합성된 지방산은 중합체 절단효소인 ACP thioesterase인 FATA와 FATB에 의해 지방산 합성이 정지된 후 자유지방산(free fatty acid) 형태로 세포질로 방출된다(Fig. 3). 이들 지방산들은 엽록체 외막에서 acyl-CoA 형태로 전환된 후 세포질의 acyl-CoA pool로 형성되어 세포막의 인지질 합성과 중성지방 합성의 구성 성분으로 사

용된다. Acyl-CoA 지방산은 케네디경로(kennedy pathway)를 거쳐 중성지방을 합성한다. 즉 Acyl-CoA 지방산은 glycerol-3-phosphate (G3P)의 sn-1과 sn-2 위치의 수산화기(-OH)에 연속적으로 결합하여 diacylglycerol (DAG)로 전환된다(Ohlrogge and Browse 1995). DAG는 cholinephosphotransferase (CPT)와 phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase (PDCT)에 의해 세포막 인지질인 phosphatidylcholine (PC)로 상호 전환되거나, DGAT 효소에 의해 sn-3위치의 지방산의 하나 더 결합시켜 중성지방을 형성한다(Fig. 3). 또한 PDAT 효소가 PC의 sn-2 위치의 지방산을 DAG의 sn-3 위치로 전이시켜 중성지방을 합성한다. 최근 kinetics 연구결과 새로 합성된 대부분의 지방산은 PC 형태에서 불포화도 증진 등으로 편집되어 세포막과 중성지방으로 전환된다고 보고되었다(Bate et al. 2012; Tjellstrom et al. 2012). 종자의 중성지방 합성의 최종반응에는 PDAT와 DGAT가 일반적으로 관여하는 것으로 보고된다(Zhang et al. 2009).

잎의 중성지방 합성 대사는 그림3에서 모식한 것처럼 명확하게 밝혀져 있지 않다. 아마도 잎의 경우도 종자의 중성지방 합성과정과 일부는 유사할 것으로 추정할 수 있다. 잎의 중성지방합성 과정은 엽록체와 세포질간에 격리되어 진행될 수 있다. 중성지방 합성효소인 DGAT가 잎이 노화되었을 때 증가됨이 보고되어 있는데 이는 노화로 엽록체 막의 당지질(galactolipid)로부터 분해 유리된 지방산이 중성지방으로 전환되는 것과 연결될 수 있다. 노화된 잎의 엽록체 안에는 중성지방과 phytylester(PE)가 축적된다(Fig. 3). Phytylester(PE) 축적에는 엽록체에 존재하는 phytyl ester synthases가 관여함이 밝혀졌으나(Lippold et al. 2012), 엽록체 내에서 노화에 의해 축적되는 중성지방이 DGAT 효소 발현의 유도과 관련이 있는지 아직 밝혀지지 않고 있다(Kaup et al. 2002).

잎의 세포질에 존재하는 중성지방의 생리학적 기능은 불분명하지만 아마도 소포체에서 인지질합성에 필요한 지방산의 초과 잉여분이 중성지방 형태로 전환 될 것으로 생각된다(Cartwright and Goodman 2012). 이들 지방은 소포체막 사이에 축적될 수 있고 세포질에 지방체로 형성될 수 있다(Chapman and Ohlrogge 2012; Murphy 2012; Fig. 3). 중성지방에 축적된 지방산은 세포막 지질로 재활용되거나 퍼옥시좀에서 분해되어 탄소원으로 재활용된다. 또한 잎의 중성지방 형성은 세포의 지질대사 초과량을 저장하는 완충역할을 할 수 있다. 그 예로 중성지방 형성이 증가되면 동시에 세포질에서 지방체 형성이 증가되었으며(Petrie et al. 2012; Andrianov et al. 2010), 잎의 지방산 분해를 억제하면 세포질에서 지방체 형성이 증가된다고 보고되었다(Slocombe et al., 2009; Kunz et al. 2009; James et al. 2010). 애기장대의 수용성 acyltransferase인 DGAT3 돌연변이 분석 결과 세포질에 과량의 중성지방



**Fig. 3** Fatty acid and TAG synthesis and their degradation in plant cell. FFA: free fatty acid, TAG: triacylglycerol, PE: phytylester, DAG: diacylglycerol, PC: phosphatidylcholine, FATA: fatty acyl thioesterase A, FATB: fatty acyl thioesterase B, CPT: cholinephosphotransferase, PDCT: phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase, DGAT: diacylglycerol acyltransferase, PDAT: phospholipid:diacylglycerol acyltransferase, PXA1: peroximal ABC transporter 1

의 축적을 보여 지방의 재활용 기작이 잎에 존재함이 보고되었다(Hernandez et al. 2012).

최근 과실에서 지방을 생산하는 기름야자(oil palm)와 자당을 생산하는 대추야자(date palm)의 전사체 분석을 통해 비종자 조직에서 지방을 축적하는 기작을 규명하려는 시도가 있었다(Bourgis et al. 2011). 그 결과 두 종간에 지방합성에 결정적인 역할을 하는 DGAT와 PDAT 등의 acyltransferase 발현 양에는 큰 차이가 없는 반면 기름야자는 대추야자보다 엽록체의 탄수소송체와 탄소를 지방합성으로 전환하는 효소 유전자의 발현이 전반적으로 높았다(Bourgis et al. 2011). 이는 기름야자의 소포체는 대추야자보다 100배나 높은 지방대사를 이용하여 효율적으로 지방으로 전환시키는 기작을 갖게 진화한 것으로 추정된다. 실제로 기름야자는 건조중량당 88%의 지방을 축적하나 대추야자는 단지 1%를 축적한다. 비종자 조직의 지방에 있어 아직 지방체 형성과 안정화에 관여하는 올레오신(oleosin)과 같은 단백질이 발견되지 않았다. 이는 잎에서 중성지방을 생산하기 위해서는 올레오신과 같은 안정화 단백질의 발현이 고려되어야 할 것이다. 또한 잎은 주로 탄수화물을 합성하여 다른 조직으로 분배하는 공급기관임을 고려할 때 잎의 지방 증진을 위해서는 탄수화물대사를 지방대사로 효율적으로 전환하는 대사 조절이 필요하다.

### 잎의 중성지방 분해와 재활용

대표적인 식물 중성지방의 분해와 재활용의 예는 종자 발아시 중성지방의 분해에 의해 에너지 이용이다(Murphy 2012). 하지만 잎에서도 종자와 동일한 기작으로 지방의 분해와 재활용이 이루어질지는 확실하지 않다(Yang and Ohlrogge 2009). 일반적으로 세포질의 중성지방은 가수분해에 의해 유리지방산이 방출되어 퍼옥시좀으로 ABC 수송체(PXA1)를 통해  $\beta$ -oxidation 과정을 거쳐 acetyl-CoA가 생성된다(Graham 2008). 발아종자와 노화된 잎에 존재하는 acetyl-CoA는 퍼옥시좀에 존재하는 glyoxylate cycle 효소, malate synthase와 isocitrate lyase 등에 의해 유기산으로 전환 된다. 이 유기산들은 퍼옥시좀에서 방출되어 세포질과 미토콘드리아에서 각각 포도당신생합성과 자당합성에 사용된다(Fig. 1). 반대로 잎의 엽육세포는 노화잎과는 다르게 acetyl-CoA를 citrate 합성에 사용한다. 그 후 특히 밤에 미토콘드리아의 tricarboxylic acid (TCA) cycle에서 호흡에 사용한다(Flugge et al. 2011) (Fig. 1). 잎에서 지방을 활용한 호흡대사와 중성지방의 재활용에 의한 세포막 지질의 합성에 대해 잘 알려져 있지 않다. 단지  $\beta$ -oxidation 과정이 결합된 돌연변이체에서 중성지방 축적이 된다는 보고가 있다(Hernandez et al. 2012). 결론적으로 잎에서 중

성지방의 안정적 생산증진을 위해서는 중성지방의 분해와 재활용 기작에 조절이 필요하다.

### 오믹스기술 이용 탄소를 지방으로 전환하는 인자 구명

현재까지 기름야자와 대추야자의 전사체 비교분석으로 WRI1이 비종자 조직에서도 중성지방 합성을 조절하는 인자일 가능성이 제시되었다(Bourgis et al. 2011). 유채 잎의 엽록체와 종자 배의 색소체에 대한 프로테오믹스 비교 분석 결과는 지방산 합성과 해당과정 효소의 발현양과 유전자의 차이가 있음이 보고되었다(Demartini et al. 2011). 또한 C4 식물 잎의 엽록체의 프로테오믹스 분석은 엽육세포와 유관속초 세포의 색소체는 지방과 전분합성 기능이 구분되어 있다(Majeran et al. 2005). 옥수수 잎의 전사체 분석을 통해 피루브산 대사와 지방산 합성에 관계가 있는 수송체 발견에 활용되었다(Chang et al. 2012). 유채 종자의 대사분배 분석 결과 엽록체 pyruvate kinase와 pyruvate dehydrogenase 뿐만 아니라 glycolytic flux의 변화가 중성지방 축적 조절에 매우 중요함이 제시되었다(Schwender and Hay 2012; Schwender et al. 2003).

저장기관인 종자와 과실처럼 지방을 축적하는 전체 기작을 잎에 적용하여 잎에서 탄소를 지방으로 전환하는 것은 단순한 작업은 아니다. 왜냐하면 식물 잎은 보통 중성지방을 축적하지 않으며, 탄수화물을 주로 합성하여 식물의 성장을 위해 모든 조직으로 탄수화물을 배분하는 역할을 하도록 유전적으로 프로그램되어 있다. 또한 잎에서 합성된 지질은 에너지 저장형태보다는 세포 활력을 유지하기 위해 사용된다. 그럼에도 불구하고 스위치그래스(switchgrass)와 같은 에너지 작물의 잎에서 건조중량당 10%의 오일을 생산한다면 현재의 식물지방 생산량을 크게 증가시킬 수 있기 때문에 최근 학자들은 잎에서 지방을 생산하는 연구에 가치를 두고 있다(Chapman and Ohlrogge 2012).

### 잎에서 중성지방 생산 연구 현황

최근 식물 잎에서 중성지방을 생산하는 연구가 여러 연구진에서 진행되고 있다. 일반적으로 지방합성 전사조절 인자인 WRI1를 35S 프로모터 조절하에 과발현시킴과 동시에 전분 합성을 억제함으로써 잎에서 중성지방 생산하고 지방체 형성을 유도하는 전략을 사용하였다(Sanjaya et al. 2011). 이러한 연구결과 볼 때 보다 많은 지방을 잎에 축적하기 위해서는 잎의 자당 방출을 억제해야 할 것으로 사료된다(Fig. 1). 이는 자당 수송체의 활성을 억제함으로써 이루어 질 수 있을 것으로 추정된다(Fig. 2).

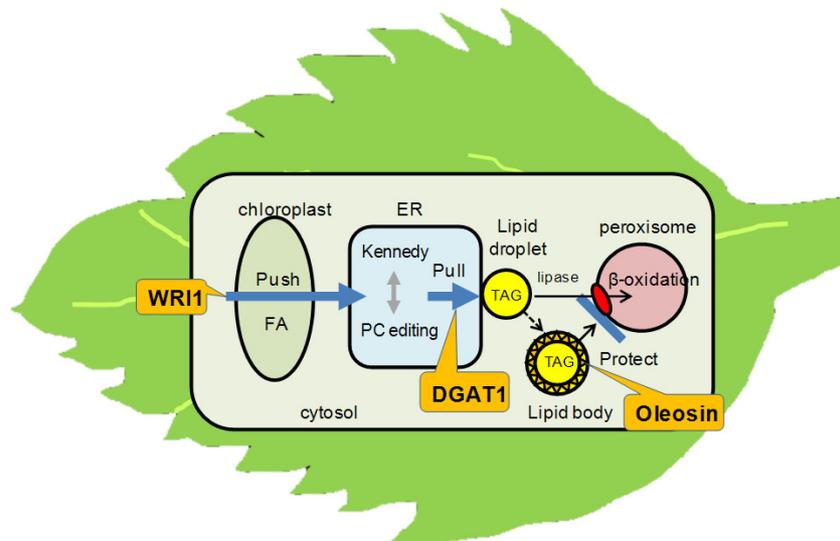
축적된 지방의 분해 기작을 억제함으로써 중성지방을 앞에서 증진시킬 수 있다. 지방산을 퍼옥시좀으로 이동하는데 관여하는 수송체인 PAX1의 돌연변이(*pxal*)는 지방산이 퍼옥시좀에서  $\beta$ -oxidation 반응에 의해 분해되는 것을 억제 하여 중성지방이 잎에 축적되도록 하였고(Fig. 3) 이렇게 축적된 잎의 지방은 압조건 하에서 더욱 증가하였다(Kunz et al. 2009). 중성지방의 축적은 호흡에 필요한 지방산으로 분해가 이루어져야 하는데, 퍼옥시좀의  $\beta$ -oxidation을 억제하였기 때문에 축적된 중성지방은 분해되지 않고 잎에서 유지되었다(Slocombe et al. 2009). 종자 발달 조절인자인 LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)의 과발현은 잎에서 중성지방을 축적하였는데 지방을 구성하는 지방산 조성이 종자의 것과 유사하였다(Slocombe et al. 2009). LEC2 발현과 동시에  $\beta$ -oxidation 억제 결과는 생성된 잎의 중성지방량은 각각의 단일시도 결과의 중성지방량과 매우 유사하였고 더욱 증가되지 않아 잎에서 지방합성 대사로 배분되는 탄소량에는 한계가 있음을 보여 주었다.

잎에서 중성지방 생산 증가에서 가장 문제점으로 예상되는 것은 중성지방의 축적이 식물생장의 성장과 발달에 악영향을 줄 수 있다는 사실이다. 그 예로 *pxal* 돌연변이는 유묘 발달에 자당이 필수적으로 필요하였으며(Zolman et al. 2001), LEC2의 과발현은 비정상적인 식물생장을 유도하였다(Stone et al. 2001). LEC2의 과발현에 의한 악영향은 LEC2를 유도성 프로모터(inducible promoter) 조절에 의해 과발현시킴으로써 식물생장시 악영향을 완화시킬 수 있었다(Andrianov et al. 2010). 이 결과 담배 잎에서 중성지방을 대조구 비형질전환체에 비해 20배 증가시켰다(Andrianov et al. 2010). 애기장대에서 동물세포의 지방분해시 유도되는 유전자와 유사성을 보이는 Comparative Gene

Identifier-58 (CGI-58) 유전자의 돌연변이체 분석결과 식물의 생장에 악영향 없이 잎에서 중성지방이 야생형 대조구에 비해 다량 축적되고 지방체가 형성되었다(James et al. 2010). 식물 CGI-58의 기능은 확인되지 못했으나 아마도 잎에서 지방의 재활용에 관여할 것으로 추정되었다(James et al. 2010).

중성지방합성에 관여하는 acyltransferase 활성 증가는 잎에서 중성지방 생산을 증진시킬 수 있었다. 그 예로 담배 잎에서 DGAT의 과발현은 중성지방 생산을 증진시켰다(Andrianov et al. 2010) (Fig. 3). 또한 해조류의 DGAT를 애기장대에 발현시킨 결과 잎의 중성지방에 다양한 길이의 지방산을 축적시켰다(Sanjaya et al. 2013). Monoacylglycerol을 중성지방으로 전환시키는 대사를 담배 잎에 적용하여 중성지방을 대조구에 비해 7배 증가시켰다(Petrie et al. 2012).

잎의 중성지방을 저장하는 지방체의 형성과 지방의 재활용에 관여하는 기작은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 잎의 지방체는 일시적인 기관으로 지질신호 대사 또는 지질재활용에 사용될 것으로 추정된다(Chapman et al. 2012; Troncoso-Ponce et al. 2013). 중성지방 생산을 증진시키려면 지방을 분해시키지 않고 안정화시키는 연구가 필요하다. 그 예로서 올레오신 또는 지방안정화 단백질로 지방체의 표면을 둘러싸서 지방 분해효소의 접근으로부터 안정화시켜야 한다(Wahlroos et al. 2003). 또한 잎에서 지방체의 형성을 유도하여 지방의 저장 능력을 향상시켜 중성지방의 합성을 증가시키는 시도가 필요하다. 최근 잎의 지방합성 능력을 상위와 하위 대사에서 동시에 증가시키고 생성된 지방의 분해를 억제하는 전략을 시도하였다(Fig. 4). 이 전략에는 상위 합성 증진 유전자로는 전사



**Fig. 4** A metabolic engineering design for TAG synthesis in leaf. Co-expression of three genes, *WRI1*, *DGAT1*, and *OLEOSIN* in leaf accumulated 15% of TAG in dry weight in leaf (Vanhercke et al. 2014). *WRI1*: *WRINKLED1*, *DGAT1*: *diacylglycerol acyltransferase 1*

인자인 WR11, 지방을 최종합성하는 하위 유전자로는 acyltransferase인 DGAT1 유전자, 그리고 지방분해를 억제하고자 지방 안정화 단백질인 올레오신 유전자를 동시에 담배 잎에 발현시켜 잎의 건조 중량당 15%의 지방을 생산하는 결과를 얻었다(Fig. 4; Vanhercke et al. 2014).

앞에서 중성지방의 축적을 촉진하기 위해서는 엽록체의 불완전한 해당대사를 완전하게 회복시키는 것이 필요할 수 있다. 이는 광합성에 의해 생성된 3-PGA를 PEP로 바로 전환하여 엽록체에서 고정된 탄소를 세포질로 손실 없이 바로 지방산합성 대사로 연결시키는 것이다(Fig. 2). 잎의 엽록체는 진화상 광합성 산물을 지방산합성에 직접 이용하는 것보다 식물의 성장을 위해 다른 조직으로 광합성 산물을 이동시키기 위해 엽록체내의 glycolytic enolase를 상실한 것으로 추정된다(Fig. 2). 엽록체에서 해당과정의 회복은 식물생장에 영향을 줄 수도 있다. 예를 들면 엽록체에서 전분의 과량 생성과 축적은 식물생장에 문제를 보인 것처럼 광합성 산물의 대부분을 지방으로 전환시 비슷한 결과를 초래할 가능성이 있다(Weise et al. 2012). 유도 또는 노화 특이적 프로모터의 활용은 식물생장에 큰 악영향 없이 전분을 7~20배 증가시켰다(Behal et al. 2002). 상기의 실험을 바탕으로 노화 특이적 프로모터를 활용하여 잎에서 엽록체에서 유실된 glycolytic enolase 발현시켜 중성지방을 잎에서 유도하는 전략을 사용할 가치가 있을 것으로 사료된다(Fig. 2).

## 적 요

식물지방은 주로 종자에서 생산되는데 인류에게 필수 지방산을 공급하는 식품 뿐만 아니라 바이오디젤 등 산업원료로 그 이용가치가 크다. 식물지방의 수요 증가에 따른 식물지방의 생산증대가 필요하다. 식물지방을 종자 이외의 바이오매스가 큰 식물의 잎에서 생산한다면 식물지방 생산 증진이 가능할 것이다. 잎은 지방을 생산하는 기관이 아니며 주로 광합성을 통해 탄소를 고정하여 다른 기관으로 탄소를 공급하는 기능을 하고 있어 지방을 생산·축적하는 기관으로 전환하는 데는 많은 고려가 필요하다. 그럼에도 불구하고 최근 지방합성 조절인자인 WRI 유전자, 지방을 생성하는 acyltransferase인 DGAT 유전자의 발현에 의해 잎에서 지방을 합성할 수 있었다. 또한 지방의 분해를 안정화하는 올레오신 단백질의 추가 도입으로 잎에서 건조중량당 15%의 중성지방 생산을 보여 잎에서 지방생산 가능성을 보여주었다(Vanhercke et al. 2014). 앞으로 바이오매스에서 지방을 생산하는 연구가 활발할 것으로 예측되며 이 기술을 식용작물이 아닌 비식용이며 바이오매스가 큰 거대역새 등에 도입하여 농지로 적합하지 않은 열악한 토지 및 간척지 등에 재배하여 실용화한

다면 미래 지속 생산 가능 친환경 바이오 원료 생산 자원으로 사용 가능하리라 사료된다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 기관고유과제(과제번호 PJ008556)와 차세대 바이오그린21사업, 시스템합성농생명공학사업단 과제(SSAC과제번호 PJ0094842014)의 연구비지원으로 수행되었습니다.

## References

- Andre C, Froehlich JE, Moll MR, Benning C (2007) A heteromeric plastidic pyruvate kinase complex involved in seed oil biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:2006-2022
- Andre C, Haslam RP, Shanklin J (2012) Feedback regulation of plastidic acetyl-coA carboxylase by 18:1-acyl carrier protein in *Brassica napus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:10107-10112
- Andrianov V, Borisjuk N, Pogrebnyak N, Brinker A, Dixon J, Spitsin S, Flynn J, Matyszczyk P, Andryszak K, Laurelli M, Golovkin M, Koprowski H (2010) Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of *Arabidopsis* DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnol J* 8:277-287
- Andriotis VM, Pike MJ, Schwarz SL, Rawsthorne S, Wang TL, Smith AM (2012) Altered starch turnover in the maternal plant has major effects on *Arabidopsis* fruit growth and seed composition. *Plant Physiol* 160:1175-1186
- Bates PD, Fatihi A, Snapp AR, Carlsson AS, Browse J, Lu C. (2012) Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols. *Plant Physiol* 160:1530-1539
- Behal RH, Lin M, Back S, Oliver DJ (2002) Role of acetyl-coenzyme a synthetase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* 402:259-267
- Bourgis F, Kilaru A, Cao X, Ngando-Ebongue GF, Drira N, Ohlrogge JB, Arondel V (2011) Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12527-12532
- Cahoon EB, Shockey JM, Dietrich CR, Gidda SK, Mullen RT, Dyer JM (2007) Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux. *Curr Opin Plant Biol* 10: 236-244
- Cartwright BR, Goodman JM (2012) Seipin: from human disease to molecular mechanism. *J Lipid Res* 53:1042-1055
- Chang YM, Liu WY, Shih AC, Shen MN, Lu CH, Lu MY, Yang HW, Wang TY, Chen SC, Chen SM, Li WH, Ku MS (2012) Characterizing regulatory and functional differentiation between

- maize mesophyll and bundle sheath cells by transcriptomic analysis. *Plant Physiol* 160:165-177
- Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT (2012) Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. *J Lipid Res* 53:215-226
- Chapman KD, Ohlrogge JB (2012) Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *J Biol Chem* 287:2288-2294
- Demartini DR, Jain R, Agrawal G, Thelen JJ (2011) Proteomic comparison of plastids from developing embryos and leaves of *Brassica napus*. *J Proteome Res* 10:2226-2237
- Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J (2008) Plant triacylglycerol as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J* 54:593-607
- Eastmond PJ, Rawsthorne S (2000) Coordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the development of oilseed rape embryos. *Plant Physiol* 122:767-774
- FAO (2003) World Agriculture: Towards 2015/2030: An FAO prospective. <http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e05c.htm>
- Fettke J, Fernie AR, Steup M (2012) Transitory starch and its degradation in higher plant cells, Starch: Origins, Structure and Metabolism. in: I. Tetlow (Ed.), *Essential Rev Exp Biol* 5: 311-374
- Flügge UI, Häusler RE, Ludewig F, Gierth M (2011) The role of transporters in supplying energy to plant plastids. *J Exp Bot* 62:2381-2392
- Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima-Ichie Y, Nakamura M, Tsuchida-Iwata Y, Shimamura M, Ohnishi J, Hata S, Gowik U, Westhoff P, Bräutigam A, Weber AP, Izui K. (2011) A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* 476:472-475
- Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* 59:115-142
- Hernández ML, Whitehead L, He Z, Gazda V, Gilday A, Kozhevnikova E, Vaistij FE, Larson TR, Graham IA (2012) A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued *Arabidopsis* seed oil catabolism mutants. *Plant Physiol* 160:215-225
- Huffman SL, Harika RK, Eilander A, Osendarp SJ (2011) Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review. *Matern Child Nutr* 7:44-65
- Hutchings D, Rawsthorne S, Emes MJ (2005) Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Exp Bot* 56:577-585
- James CN, Horn PJ, Case CR, Gidda SK, Zhang D, Mullen RT, Dyer JM, Anderson RG, Chapman KD (2010) Disruption of the *Arabidopsis* CGI-58 homologue produces chandler-like lipid droplet accumulation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17833-17838
- Kaup MT, Froese CD, Thompson JE (2002) A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol* 129:1616-1626
- Kunz HH, Scharniewski M, Feussner K, Feussner I, Flügge UI, Fulda M, Gierth M (2009) The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness. *Plant Cell* 21:2733-2749
- Lin WL, Oliver DJ (2008) Role of triacylglycerols in leaves. *Plant Sci* 175:233-237
- Lippold F, vom Dorp K, Abraham M, Hölzl G, Wewer V, Yilmaz JL, Lager I, Montandon C, Besagni C, Kessler F, Stymne S, Dörmann P (2012) Fatty acid phytyl ester synthesis in chloroplasts of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:2001-2014
- Lu C, Napier JA, Clemente TE, Cahoon EB (2011) New frontiers in oilseed biotechnology: meeting the global demand for vegetable oils for food, feed, biofuel, and industrial applications. *Curr Opin Biotechnol* 22:252-259
- Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ (2005) Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell* 17:3111-3140
- Murphy DJ (2012) The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249:541-585
- Ohlrogge J, Browse J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7:957-970
- Ohlrogge JB, Jaworski JG (1997) Regulation of fatty acid synthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:109-136
- Petrie JR, Vanhercke T, Shrestha P, El Tahchy A, White A, Zhou XR, Liu Q, Mansour MP, Nichols PD, Singh SP (2012) Recruiting a new substrate for triacylglycerol synthesis in plants: the monoacylglycerol acyltransferase pathway. *PLOS ONE* 7:e35214
- Prabhakar V, Löttgert T, Geimer S, Dörmann P, Krüger S, Vijayakumar V, Schreiber L, Göbel C, Feussner K, Feussner I, Marin K, Staehr P, Bell K, Flügge UI, Häusler RE. (2010) Phosphoenolpyruvate provision to plastids is essential for gametophyte and sporophyte development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22:2594-2617
- Pracharoenwattana I, Cornah JE, Smith SM (2005) *Arabidopsis* peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *Plant Cell* 17:2037-2048
- Rawsthorne S (2002) Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Prog Lipid Res* 41:182-196
- Sanjaya, Durrett TP, Weise SE, Benning C (2011) Increasing the energy density of vegetative tissues by diverting carbon from starch to oil biosynthesis in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* 9:874-883
- Sanjaya, Miller R, Durrett TP, Kosma DK, Lydic TA, Muthan B, Koo AJ, Bukhman YV, Reid GE, Howe GA, Ohlrogge J, Benning C (2013) Altered lipid composition and enhanced nutritional value of *Arabidopsis* leaves following introduction of an algal diacylglycerol acyltransferase 2. *Plant Cell* 25:677-693
- Schwender J, Hay JO (2012) Predictive modeling of biomass component tradeoffs in *Brassica napus* developing oilseeds based on in silico manipulation of storage metabolism. *Plant Physiol* 160:1218-1236
- Schwender J, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y (2003) A flux model of

- glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *J Biol Chem* 278: 29442-29453
- Slocombe SP, Cornah J, Pinfield-Wells H, Soady K, Zhang Q, Gilday A, Dyer JM, Graham IA (2009) Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways. *Plant Biotechnol J* 7:694-703
- Stitt M, Zeeman SC (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* 15:282-292
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11806-11811
- Tjellström H, Yang Z, Allen DK, Ohlrogge JB (2012) Rapid kinetic labeling of Arabidopsis cell suspension cultures: implications for models of lipid export from Plastids. *Plant Physiol* 158:601-611
- Troncoso-Ponce MA, Cao X, Yang Z, Ohlrogge JB (2013) Lipid turnover during senescence. *Plant Sci* 205-206:13-19
- Vanhercke T, El Tahchy A, Liu Q, Zhou XR, Shrestha P, Divi UK, Ral JP, Mansour MP, Nichols PD, James CN, Horn PJ, Chapman KD, Beaudoin F, Ruiz-López N, Larkin PJ, de Feyter RC, Singh SP, Petrie JR (2014) Metabolic engineering of biomass for high energy density: oilseed-like triacylglycerol yields from plant leaves. *Plant Biotechnol J* 12:231-239
- Wahlroos T, Soukka J, Denesyuk A, Wahlroos R, Korpela T, Kilby NJ (2003) Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells. *Genesis* 35:125-132
- Weber AP, Linka N (2011) Connecting the plastid: transporters of the plastid envelope and their role in linking plastidial with cytosolic metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 62:53-77
- Weise SE, Aung K, Jarou ZJ, Mehrshahi P, Li Z, Hardy AC, Carr DJ, Sharkey TD. (2012) Engineering starch accumulation by manipulation of phosphate metabolism of starch. *Plant Biotechnol J* 10: 545-554
- Yang Z, Ohlrogge JB (2009) Turnover of fatty acids during natural senescence of Arabidopsis, brachypodium, and switchgrass and in Arabidopsis beta-oxidation mutants. *Plant Physiol* 150:1981-1989
- Zhang M, Fan J, Taylor DC, Ohlrogge JB (2009) DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in Arabidopsis triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell* 21:3885-3901
- Zolman BK, Silva ID, Bartel B (2001) The Arabidopsis pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol* 127:1266-1278