

## 식물에서 shikimate 및 방향족 아미노산 생합성 경로와 이의 대사공학적 응용

임선형 · 박상규 · 하선화 · 최민지 · 김다혜 · 이종렬 · 김영미

### Biosynthetic pathway of shikimate and aromatic amino acid and its metabolic engineering in plants

Sun-Hyung Lim · Sang Kyu Park · Sun-Hwa Ha · Min Ji Choi · Da-Hye Kim · Jong-Yeol Lee · Young-Mi Kim

Received: 14 April 2015 / Revised: 11 May 2015 / Accepted: 29 May 2015  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The aromatic amino acids, which are composed of L-phenylalanine, L-tyrosine and L-tryptophan, are general components of protein synthesis as well as precursors for a wide range of secondary metabolites. These aromatic amino acids-derived compounds play important roles as ingredients of diverse phenolics including pigments and cell walls, and hormones like auxin and salicylic acid in plants. Moreover, they also serve as the natural products of alkaloids and glucosinolates, which have a high potential to promote human health and nutrition. The biosynthetic pathways of aromatic amino acids share a chorismate, the common intermediate, which is originated from shikimate pathway. Then, tryptophan is synthesized via anthranilate and the other phenylalanine and tyrosine are synthesized via prephenate, as intermediates. This review reports recent studies about all the enzymatic steps involved in aromatic amino acid biosynthetic pathways and their gene regulation on transcriptional/post-transcriptional levels. Furthermore, results of metabolic engineering are introduced as efforts to improve the production of the aromatic amino acids-derived secondary metabolites in plants.

**Keywords** Aromatic amino acid, Metabolic engineering

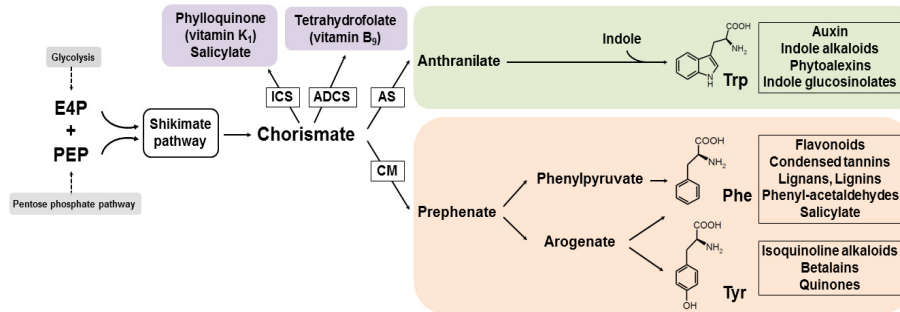
S.-H. Lim (✉), S. K. Park · M. J. Choi · D.-H. Kim · J.-Y. Lee · Y.-M. Kim  
국립농업과학원, 농촌진흥청, 전주, 560-500, 대한민국  
(National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, JeonJu, 560-500, Korea)  
e-mail: limsh2@korea.kr

S.-H. Ha  
생명공학원, 경희대학교, 용인, 446-701, 대한민국  
(Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin, 446-701, Korea)

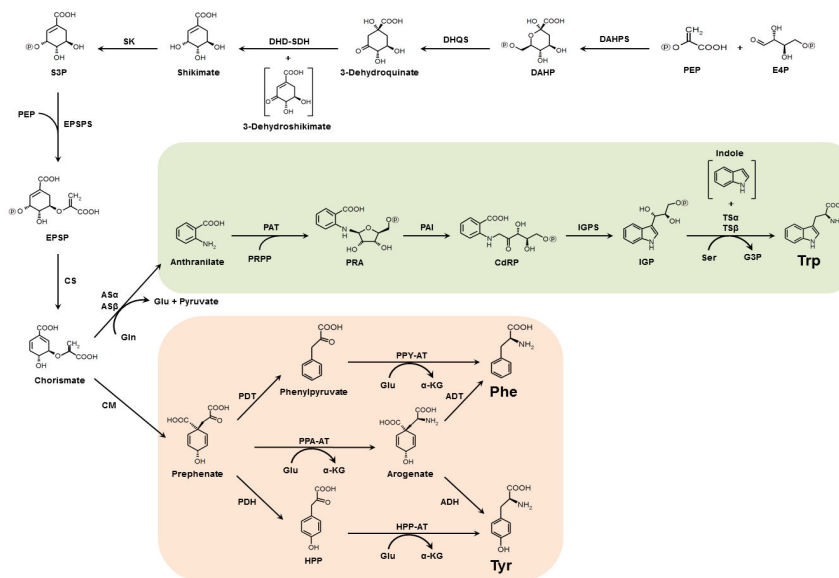
### 서론

방향족 아미노산인 트립토판(L-Tryptophan), 페닐알라닌(L-phenylalanine), 티로신(L-tyrosine)은 모든 생명체의 단백질 생합성에 필수성분이다. 방향족 아미노산의 합성은 shikimate 경로와 chorismate 경로를 통해 이루어지며, 이러한 대사 경로들은 몇몇 원생생물, 박테리아, 곰팡이, 식물에서 존재하나 동물에는 존재하지 않는다(Galili and Hoefgen 2002). 인간과 단위가축(monogastric)에 방향족 아미노산은 필수 영양물질일 뿐 아니라, 트립토판과 티로신은 각각 신경 전달물질인 세라토닌과 카테콜라민의 전구체로서 중요성을 지닌다. 뿐만 아니라 방향족 아미노산과 그 유도체들은 약리적, 생리적 활성효과를 지니므로, 다양한 의약품, 화장품, 식품, 염료, 농약 및 기타 특수소재 등에 직, 간접적으로 광범위하게 사용되고 있다(Leonard et al. 2009).

방향족 아미노산은 식물의 성장과 발달, 생식, 방어, 환경적 반응 등에서 결정적 역할을 하는 매우 다양한 식물 이차 대사물질들의 전구체이다(Fig. 1). 트립토판은 식물 호르몬인 옥신(auxin)과 다양한 이차 대사물질, 알칼로이드(alkaloids), 파이토알렉신(phytoalexins), 인돌 글루코시놀레이트(indole glucosinolates)의 전구체이다. 또한 티로신은 이소퀴놀린 알칼로이드(isoquinoline alkaloids), 베타라인(betalains) 색소, 퀴논(quinones)의 전구체이다. 페닐알라닌은 다양한 페놀릭 화합물의 전구물질로 사용되는데, 대표적으로 플라보노이드(flavonoids), 중합 탄닌(condensed tannins), 리그닌 화합물(lignans, lignins), 휘발성 페닐프로파노이드/벤제노이드(phenylpropanoid/benzenoid volatiles) 화합물의 전구체이다. 또한 방향족 아미노산의 전구물질인 chorismate는 비타민 K<sub>1</sub>과 B<sub>9</sub> 및 식물 방어물질로 알려진 살리실산(salicylic acid)의 전구물질로 이용된다(Maeda and Dudareva 2012).



**Fig. 1** Schematic diagram of the shikimate and aromatic amino acid biosynthetic pathway in plant. Secondary metabolites derived from chorismate, tryptophan (Trp), both phenylalanine (Phe) and tyrosine (Tyr) was shown in a light purple box, a light green box and a light orange box, respectively. ADCS, aminodeoxychorismate synthase; AS, anthranilate synthase; CM, chorismate mutase; ICS, isochorismate synthase



**Fig. 2** Shikimate and aromatic amino acid biosynthetic pathway. Through seven enzymatic reactions of the shikimate pathway, chorismate was produced. Trp is produced from chorismate via six enzymatic reactions of the Trp pathway (light green box), whereas Phe and Tyr are produced via three reactions in the arogenate or phenylpyruvate/4-hydroxyphenylpyruvate routes (light orange box). Other abbreviations: CdRP, 1-(o-carboxyphenylamino)-1-deoxy-ribose 5-phosphate; DAHP, 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonate 7-phosphate; EPSP, 5-*enol*pyruvylshikimate 3-phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; HPP, 4-hydroxyphenylpyruvate; IGP, Indole-3-glycerol phosphate;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -ketoglutarate; PRPP, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; PRA, 5-phosphoribosylanthranilate; S3P, shikimate-3-phosphate; Ser, serine. Enzyme abbreviations: ADH, arogenate dehydrogenase; ADT, arogenate dehydratase; AS $\alpha$ , anthranilate synthase  $\alpha$  subunit; AS $\beta$ , anthranilate synthase  $\beta$  subunit; CM, chorismate mutase; CS, chorismate synthase; DAHPS, 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonate 7-phosphate synthase; DHD-SDH, 3-dehydroquinamate dehydratase-shikimate dehydrogenase; DHQS, 3-dehydroquinamate synthase; EPSPS, 5-*enol*pyruvylshikimate 3-phosphate synthase; HPP-AT, 4-hydroxyphenylpyruvate aminotransferase; IGPS, indole-3-glycerol phosphate synthase; PAI, phosphoribosylanthranilate isomerase; PAT, phosphoribosylanthranilate transferase; PDH, prephenate dehydrogenase; PDT, prephenate dehydratase; PPA-AT, prephenate aminotransferase; PPY-AT, phenylpyruvate aminotransferase; SDH, shikimate dehydrogenase; SK, shikimate kinase; TS $\alpha$ , tryptophan synthase  $\alpha$  subunit; TS $\beta$ , tryptophan synthase  $\beta$  subunit

본 리뷰에서는 인류 건강증진, 의약, 농업 등 다양한 산업 분야에서 중요하게 고려되는 식물의 방향족 아미노산 생산과 현재까지 규명된 관련 효소들의 분자적 특성, 전사 및 전사 후 조절에 대한 정보를 제공하며 또한 식물체 내의 방향족 아미노산 생산을 높이기 위해 시도된 그동안의 대사공학적인 접근에 대해 되짚어 보며 앞으로 연구되어야 할 과제들을 제시하고자 한다.

## Shikimate 생합성 경로

Shikimate 경로는 1차 대사와 방향족 아미노산 생합성을 연결하는 경로로서, 해당과정을 통해 생산된 phosphoenolpyruvate (PEP)와 5탄당 인산화 과정을 통해 생산된 erythrose 4-phosphate (E4P)를 이용하여 7단계의 효소반응을 통해 chorismate를 합성한다(Fig. 2). Shikimate 경로 관련 효소들은 생화학적

**Table 1.** Enzyme and genes involved in shikimate and aromatic amino acid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*, rice and tomato

Enzyme	Abbreviation	<i>Arabidopsis thaliana</i> <sup>a</sup>	<i>Solanum lycopersicum</i> <sup>b</sup>	<i>Oryza sativa</i> <sup>c</sup>
<b>Shikimate Pathway</b>				
3-Deoxy-D- <i>arabino</i> -heptulosonate 7-phosphate synthase	DAHPS	At1g22410	SI04g074480	Os03g27230
		At4g33510	SI11g009080	Os07g42960
		At4g39980	SI01g105390	Os08g37790
			SI01g105420	Os10g41480
3-Dehydroquinate synthase	DHQS	At5g66120	SI02g083590 SI03g058860	Os09g36800
3-Dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase	DHD/SDH	At3g06350	SI01g067750	Os01g27750
			SI06g084460	Os01g27780
			SI09g011730	Os12g34870
			SI10g038080	
Shikimate kinase	SK	At2g21940	SI02g094420	Os01g01302
		At2g35500	SI04g051860	Os02g51410
		At3g26900	SI07g044970	Os04g54800
		At4g39540	SI08g076410	Os06g12150 Os10g42700
5- <i>Enol</i> pyruvylshikimate 3-phosphate synthase	EPSPS	At1g48860	SI01g091190	Os06g04280
		At2g45300	SI05g050980	
			SI09g005460	
Chorismate synthase	CS	At1g48850	SI04g009620 SI04g049350	Os03g14990
Aminodeoxychorismate synthase	ADCS	At2g28880	SI04g049360	Os06g48620
Isochorismate synthase	ICS	At1g73805 At1g74710	SI06g071030	Os09g19734
<b>Tryptophan Pathway</b>				
Anthranilate synthase	AS	At1g24807	SI06g005980	Os03g15780
		At1g24909	SI06g006100	Os03g50880
		At1g25083	SI12g010180	Os03g61120
		At1g25155		Os04g38950
		At1g25220		Os06g48620
		At2g28880		
		At2g29690		
		At3g55870		
		At5g05730 At5g57890		
Phosphoribosylanthranilate transferase	PAT	At5g17990	SI04g025540	Os01g40480
		At1g70570	SI06g071550	Os02g44490
			SI12g035190	Os02g57090
				Os03g03450
				Os03g44890
				Os04g39680
				Os04g58720 Os04g59520 Os05g30750 Os05g35480 Os06g41090 Os07g07070 Os07g30020

(to be continued)

**Table 1.** Enzyme and genes involved in shikimate and aromatic amino acid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*, rice and tomato

Enzyme	Abbreviation	<i>Arabidopsis thaliana</i> <sup>a</sup>	<i>Solanum lycopersicum</i> <sup>b</sup>	<i>Oryza sativa</i> <sup>c</sup>
Phosphoribosylanthranilate isomerase	PAI	At1g07780	Sl02g076760	Os02g16630
		At1g29410	Sl06g051410	
		At5g05590		
Indole-3-glycerol phosphate synthase	IGPS	At2g04400	Sl03g111850	Os04g39270
		At5g48220		Os08g23150
				Os09g08130
Tryptophan synthase alpha subunit	TS	At3g54640	Sl01g098550	Os03g58260
		At4g02610		Os03g58290
				Os03g58300
				Os03g58320
				Os07g08430
Tryptophan synthase beta subunit	TS	At4g27070	Sl05g046350	Os06g42560
		At5g28237	Sl10g018380	Os08g04180
		At5g38530	Sl07g064280	
		At5g54810	Sl10g005320	
			Sl10g006400	
			Sl10g018390	
	Sl12g096190			
<b>Phenylalanine/Tyrosine Pathway</b>				
Chorismate mutase	CM	At1g69370	Sl02g088460	Os01g55870
		At3g29200	Sl11g017240	Os02g08410
		At5g10870		Os08g34290
			Os12g38900	
Prephenate aminotransferase	PPA-AT	At1g77670	Sl03g120450	Os01g65090
		At1g80360	Sl04g054710	
		At2g22250	Sl11g013170	
Arogenate dehydratase /prephenate dehydratase	ADT /PDT	At1g08250	Sl02g080620	Os03g17730
		At1g11790	Sl06g050630	Os04g33390
		At2g27820	Sl06g074530	Os07g32774
		At3g07630	Sl07g007590	Os07g49390
		At3g44720	Sl09g011870	Os09g39230
		At5g22630	Sl11g066890	Os10g37980
		Sl11g072520		
Arogenate dehydrogenase/prephenate dehydrogenase	ADH/PDH	At1g15710	Sl06g050630	Os06g35050
		At5g34930	Sl06g060930	Os06g49505
			Sl07g007590	Os06g49520
			Sl09g011870	
Phenylpyruvate/4-hydroxyphenylpyruvate aminotransferases	PPY-AT/HPP-AT	At2g20610	Sl07g053710	Os02g20360
		At2g24850	Sl07g053720	Os06g23684
		At4g23590	Sl10g007110	Os11g42510
		At4g23600	Sl10g008200	
		At4g28410		
		At4g28420		
		At5g36160		
		At5g53970		

<sup>a</sup>data available from TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>)<sup>b</sup>data available from TIGR (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)<sup>c</sup>data available from PLAZA 3.0 (<http://plaza.psb.ugent.be/>)

특성이 규명되어왔고, 각각의 해당 유전자들이 미생물과 식물에서 밝혀져 왔다. 대표적인 애기장대, 토마토, 벼에서의 shikimate 경로 관련 효소의 유전자는 Table 1에 나타내었다. 식물에서의 shikimate 경로 관련 효소들에 대한 다양한 실험적 결과와 세포 내 위치 예측 분석을 수행한 결과 대다수의 효소는 색소체(plastid)에 존재하는 것으로 판단된다(Emanuelsson et al. 1999).

### 3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase (DAHPS)

Shikimate 경로의 첫 번째 단계 효소인 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (DAHPS)는 PEP와 E4P의 알돌(aldol) 축합을 통해 DAHP를 생성한다. DAHPS는 2가 금속양이온( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ )을 포함하는 금속효소(metalloenzyme)이다(Huisman and Kosuge 1974; Rubin and Jesen 1985). 중심부는 원통(barrel)형  $\beta/\alpha$  motif가 8개 존재하는( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> 단량체(monomer) 구조이고, 주변부는 방향족 아미노산에 의한 다른자리 입체성(allosteric)에 의해 조절되며 다양한 변이를 나타내고 있다. DAHPS는 아미노산 상동성에 따라서 2개의 유형으로 나누어진다(Tzin and Galili 2010). 미생물유래의 type I DAHPS에는 대장균의 AroF, AroG, AroH와 N말단 페닐알라닌/티로신 결합부위를 지닌 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 Aro3, Aro4, 바실러스(*Bacillus subtilis*)의 chorismate mutase (CM)-DAHPS 활성을 지닌 이중기능성 효소가 해당된다(Benfey and Chua 1989; Wu and Woodard 2006). 식물과 몇몇 미생물(예로, *Mycobacterium tuberculosis*)에서 보고되는 type II DAHPS는 중심부 원통형 구조와 방향족 아미노산에 의해 피드백 저해(feedback inhibition)를 받는 다른자리 입체성 부위를 지니고 있다(Webby et al. 2005).

식물에서 보고되는 type II DAHPS는 비록 대장균과 효모와는 상동성이 매우 적으나, 이들 미생물의 DAHPS 돌연변이체를 이용한 상보성 검정(complementation test)을 수행하여 몇몇 식물 중에서 동형(isotype) DAHPS들이 분리되었다(Dyer et al. 1990; Keith et al. 1991). 애기장대의 경우에는 3개의 유전자가 DAHPS를 암호화하고 있는 것으로 밝혀져 있으나 몇몇 식물 중에서는 2개 또는 많게는 8개까지의 유전자가 암호화하고 있는 것으로 확인된다. 애기장대의 *DAHPS1* 유전자는 상처나 병원균 감염 1시간 이내에 강하게 발현이 유도되었고, 더불어 페닐프로파노이드 경로의 첫 번째 효소인 *PAL* 유전자의 발현도 증가하였다(Gorlach et al. 1995). 이러한 *DAHPS*와 *PAL* 유전자의 초기 발현증가는 상처나 병원균 감염과 관련한 방어 물질 생산에 이들 유전자가 기능함을 시사한다. 반면, 애기장대 *DAHPS2* 유전자 발현은 변화되지 않았는데, 이것은 물질대사를 조절하는데 있어 두 유전자간 차이가 있으며 *DAHPS1*이 이차 대사물질 생합성의 변화에 대한 주

요 효소를 암호화함을 시사한다.

### 3-Dehydroquinate Synthase (DHQS)

Shikimate 경로의 두 번째 효소인 3-dehydroquinate synthase (DHQS)는  $Co^{2+}$ 와 같은 2가 양이온과  $NAD^+$ 를 보조인자(co-factor)로 사용하여 DAHP를 3-dehydroquinate로 변환시킨다. 곰팡이의 경우에는 AroM 복합체로 알려진 5중 기능성 효소가 DAHP를 5-enol pyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP)로 변환시키는 5단계의 연속반응을 수행한다고 알려져 있는 반면, 대장균과 식물에서의 DHQS는 단일기능성 효소이다(Duncan et al. 1987; Bischoff et al. 1996). 대부분의 식물 중에서 DHQS 유전자는 1 copy로 존재하나, 콩의 경우 계놈 내에 2 copy로 존재한다(Tohge et al. 2013). 애기장대 *AtDHQS* 유전자는 1차 줄기 발달 과정에서 발현이 증가되는데, 이는 리그닌 생합성에 요구되는 페닐알라닌 생합성에 *AtDHQS*가 관여함을 말해준다(Ehrling et al. 2005). 애기장대의 경우, 대부분의 shikimate 생합성 유전자들의 발현은 페닐프로파노이드 물질 생산과 상관관계를 보였으나, DHQS 유전자의 발현은 그러한 경향을 보이지 않았다(Hamberger et al. 2006).

### 3-Dehydroquinate Dehydratase (DHD)-Shikimate Dehydrogenase (SDH)

3-Dehydroquinate dehydratase (DHD)와 shikimate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase로도 불리는 shikimate dehydrogenase (SDH)는 shikimate 경로의 세 번째와 네 번째 효소반응을 촉매하여 shikimate를 생산한다. DHD는 3-dehydroquinate의 탈수화(dehydration)를 통해 3-dehydroshikimate를 생산하고, SDH는 NADPH를 보조인자로 사용하여 3-dehydroshikimate를 shikimate로 역 환원시킨다. 이들 효소의 구성은 생물계에 따라서 뚜렷한 차이를 나타낸다. 곰팡이에서 이들 효소는 AroM 복합체의 일부로 구성되고, 대장균의 AroD, AroE는 각각 단일기능성 효소이며, 식물의 경우에는 DHD-SDH 형태로 융합된 이중기능성 효소이다(Duncan et al. 1987; Anton and Coggins 1988; Bischoff et al. 2001). 식물에서 SDH 효소 활성도는 DHD 효소활성보다 10배 이상 높게 나타나고 있으며, 생산된 3-dehydroshikimate를 효과적으로 shikimate로 변환시킨다(Fiedler and Schultz 1985). 이러한 이중기능성 효소들은 페놀릭 이차 대사경로의 물질 생산에 중요한 역할을 하리라 판단된다.

애기장대를 포함한 여러 식물 중에서 *DHD-SDH*는 단일 유전자로 존재하고 색소체 적중서열을 지니는 것으로 판단되어왔다(Bischoff et al. 2001; Singh and Christendat 2006). 애기장대 *AtDHD-SDH* 유전자는 자성 배우체 발달 및 기능에 요구되는 것으로 보여졌는데, 이는 shikimate

경로가 식물의 생식에도 관여함을 의미한다(Pagnussat et al. 2005). 예외적으로, 담배에서는 계놈 내에 색소체와 세포질의 *DHD-SDH*를 암호화하는 두 개의 유전자들이 보고되었다(Ding et al. 2007). 담배에서 색소체 *NiDHD-SDH1* 유전자의 RNAi 발현억제시 강한 성장억제와 더불어서 방향족 아미노산, 리그닌, chlorogenic acid의 생산이 감소되었고, 효소의 기질과 산물인 3-dehydroquinate와 shikimate가 축적되었다(Ding et al. 2007). 이것은 세포질 *DHD-SDH* 유전자인 *NiDHD-SDH2*의 효소 활성에 의해 dehydroquinate가 세포질에서 shikimate로 전환된 결과일 수 있지만, 아직까지 정확한 세포질 *DHD-SDH*의 역할이 밝혀지지 않고 있다.

### Shikimate Kinase (SK)

Shikimate kinase (SK)는 ATP를 보조인자로 사용해서 shikimate를 인산화시켜 shikimate 3-phosphate를 생성시킨다. 대장균의 경우에는 2개의 SK 유전자가 존재하는데 식물에서는 종에 따라 그 수가 다양하다. 애기장대는 4개, 토마토는 4개, 벼(*Oryza sativa*)는 5개의 SK 유전자를 지닌다(Schmid et al. 1992; Kasai et al. 2005; Fucile et al. 2011). 애기장대의 *AtSK1* 발현은 고온 스트레스에 의해 10배 이상 증가하였고 효소 활성이 안정적인 반면, *AtSK2*의 발현은 변화되지 않았으며 열에 불안정한 활성을 나타냈다(Fucile et al. 2011). 식물이 고온 스트레스를 받을 경우 손상된 단백질을 대체하기 위해서 heat shock proteins (HSPs) 합성을 증가시키며, 산화적 손상으로부터 세포 보호를 위해 안토시아닌과 같은 페닐프로파노이드 물질 생산을 증가시킨다. 고온에 안정적인 *AtSK1* 유전자는 HSPs 합성에 필요한 방향족 아미노산 및 안토시아닌 생성을 위해 shikimate 경로의 metabolic flux를 증가시키는데 관여하는 것으로 보인다. 시금치(*Spinacia oleracea*)의 SK 단백질 실험에서는 ATP를 사용하는 다른 효소들과 마찬가지로, ATP, ADP, AMP의 상대적 농도에 따른 energy charge의 상태에 의해 활성이 조절된다고 보고되었다(Huang et al. 1975). 이것은 식물에서 SK가 shikimate 경로에서 요구되는 에너지와 세포 내의 에너지를 균형적으로 조절하는 데 중요한 역할을 하고 있음을 암시한다.

### 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase (EPSPS)

5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS)는 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase라고도 지칭되는 효소로 PEP의 enolpyruvyl unit을 shikimate 3-phosphate의 5-hydroxyl position으로 이동시킴으로써 EPSP의 생성을 촉매한다. EPSPS는 광범위하게 사용되는 제초제인 글리포세이트(glyphosate)의 목표 단백질로 알려져 있고, 글리포세이트에 대한 감

응도에 따라 두 그룹으로 분류되어 왔다. 대장균을 포함한 대부분의 박테리아와 식물은 글리포세이트에 민감한 class I EPSPS를 지니는 반면에, 아그로박테리아(*Agrobacterium* sp. strain CP4)와 같은 몇몇 박테리아는 class II EPSPS를 지니며 이들은 글리포세이트에 저항성을 나타내므로 글리포세이트 저항성 작물 개발에 이용되어 왔다(Funke et al. 2006).

지금까지 애기장대, 사과, 포도 및 옥수수 등의 계놈 내에서 각각 2개의 EPSPS 유전자들이 보고되어왔다(Klee et al. 1987; Gasser et al. 1988; Forlani et al. 1994). 모든 식물 종의 EPSPS에는 LP(G/S)KSLSNRILLLAAL와 LFLGNAGTAMRPL 모티프가 보존되어 있다. 보존 아미노산 잔기는 EPSPS 효소의 촉매 기능과 글리포세이트와의 결합에 관여한다(Huynb et al. 1998). Shikimate 생합성 경로의 유전자들의 발현과 유사하게, 병원균 또는 유도인자에 의해서 EPSPS 유전자의 발현이 상향 조절되며, 일반적으로 EPSPS 유전자는 낮은 수준에서 상시 발현하지만, 페튜니아는 페닐알라닌 유래의 휘발성 물질이 생산되는 꽃잎 조직에서 발달단계별 조직특이적으로 발현되기도 한다(Gasser et al. 1988; Garg et al. 2014). 한편 EPSPS 유전자를 과발현시킨 작물의 경우에는 트립토판, 광합성물, 종자발아율 등과 같은 작물 적응력이 증가하였다(Wang et al. 2014).

### Chorismate Synthase (CS)

Chorismate synthase (CS)는 EPSP의 3-phosphate와 C6-*pro-R* hydrogen을 제거하여 ring 구조에 두 번째 이중결합을 형성시킴으로써 chorismate를 생성하는 shikimate 경로의 마지막 반응을 촉매한다. 이 반응은 보조인자로 환원 플라빈 모노뉴클레오타이드(reduced Flavin mononucleotides, FMN)를 필요로 한다(Macheroux et al. 1999). 서로 다른 생물계의 CS들이 매우 높은 상동성과 단백질 구조의 유사성, 비슷한 보조인자 결합 특이성과 효소활성적 특성을 나타내지만, 산화된 FMN을 환원시키는 능력에 따라 두 그룹으로 구분되어 왔다(Schaller et al. 1991b; Maclean and Ali 2003; Quevillon-Cheruel et al. 2004). 곰팡이의 CS들은 이중기능성 효소의 일부로써 NADPH-dependent flavin reductase와 결합되어 기능을 지니는 반면, 대부분의 박테리아와 식물은 외부에서 공급되는 환원 플라빈 모노뉴클레오타이드에 의존하는 단일기능성 효소를 지닌다(Mousdale and Coggins 1986; Schaller et al. 1991a;1991b). 지금까지 CS를 암호화하는 유전자는 애기장대는 1개, 토마토는 2개를 지니는 것으로 밝혀져 왔다(Mousdale and Coggins 1986; Grolach et al. 1993). 보리의 *HvCS* 유전자를 침입저항성에 감수성인 야생형 *Mlo*(*Mildew resistance locus o*) 개체에 과발현시켰을 때, 병원균에 대한 저항성이 크게 증가했다(Pingsha et al. 2009). 이것은 CS 유전자가 병원균의 침입

과정에서 생성되는 방어물질 생산에 관여하며 식물의 병에 대한 저항성을 부여함을 말해준다. 토마토의 경우, 1차 전사체의 선택적 스플라이싱에 의해 두 가지 *LeCSI*과 *LeCS2* 유전자를 가지며 조직별 발현 비율도 다르게 나타났다. 이것은 특정 환경인자 혹은 유도인자에 대한 두 유전자들의 발현양상이 차이를 보이며 조절 메커니즘도 다를 것이라 추측하게 한다(Gorlach et al. 1995).

CS 유전자에 의해서 합성된 chorismate는 shikimate 경로의 최종산물이자, 방향족 아미노산 합성을 위한 전구체이며, chorismate 유래의 대사산물을 제공하는 물질로도 사용된다. 생성된 chorismate를 기질로 하여 방향족 아미노산 및 chorismate 유래 대사물질들의 최초반응에 해당하는 효소들이 경쟁하게 된다. 비타민 B<sub>9</sub>으로 불리는 엽산(tetrahydrofolate)은 aminodeoxychorismate synthase (ADCS) 효소반응을 통해 생성되고, 식물호르몬인 살리실산 합성 및 비타민 K<sub>1</sub>으로 불리는 phyloquinone의 생합성은 isochorismate synthase (ICS) 효소반응으로 생성되며, 방향족 아미노산인 트립토판은 anthranilate synthase (AS) 효소반응을 거쳐 생성되고, 페닐알라닌과 티로신은 chorismate mutase (CM) 효소반응을 통해 생성된다(Wildermuth et al. 2001; Basset et al. 2004; Gross et al. 2006; Kim et al. 2008; Waller et al. 2010).

## 방향족 아미노산 생합성 경로

### 트립토판 생합성 경로

방향족 아미노산인 트립토판은 chorismate를 기질로 하여 여섯 단계의 효소반응을 통해 생성된다. 트립토판 대사 경로에 관여하는 모든 생합성 효소들은 색소체에 위치하거나 또는 위치하는 것으로 예측 된다(Zhao and Last 1995; Kriechbaumer et al. 2008). 미생물에서 종종 발견되는 트립토판 생합성 대사경로의 다중기능성 효소들과 달리 식물 효소들은 모두 단일기능성 효소들로 밝혀졌다(Radwanski and Last 1995a).

### Anthranilate Synthase (AS)

트립토판 생합성의 첫 번째 단계인 anthranilate 생성을 촉매하는 효소는 anthranilate synthase (AS)이다. AS는 두 개의 알파 서브유닛(AS $\alpha$ )과 두 개의 베타 서브유닛(AS $\beta$ )으로 구성되며  $\alpha_2\beta_2$  사량체(tetramer)를 형성한다(Romero et al. 1995a). AS $\alpha$ 는 chorismate에 결합하여 아미노화(amination) 반응과 pyruvate 제거반응을 촉매하는 활성을 지니고, AS $\beta$ 는 glutamine을 가수분해하여 AS $\alpha$ 에 암모니아(ammonia)를 제공하는 활성을 지닌다. 대부분의 고등식물은 두 개

의 AS $\alpha$  유전자와 하나의 AS $\beta$  유전자를 지니는 것으로 알려져 있다. 2개의 AS $\alpha$  유전자중 하나는 상시 발현하는 반면, 나머지 하나는 발생, 상처 처리, 병원균 처리에 의해 발현 유도된다(Niyogi and Fink 1992; Tozawa et al. 2001). 이러한 유전자 발현 양상은 트립토판 유래 천연물질의 생산이 식물 방어 기작에 관여한다는 것을 시사한다. 대부분의 식물 AS 효소는 AS $\alpha$ 에 트립토판이 결합해 피드백 저해를 받는 것으로 알려지고 있다(Morollo and Eck 2001). 일반적으로 다양한 식물 중에서 피드백 비민감성(feedback insensitive) AS를 암호화하는 유전자를 과다발현시킬 경우 트립토판과 이차 대사산물의 생산이 증가한다(Li and Last 1996; Tozawa et al. 2001; Hughes et al. 2004).

애기장대의 AS $\beta$  서브유닛의 유전자가 손상된 *trp4* 돌연변이체는 anthranilate의 생산이 억제된다. Anthranilate는 UV 광조건에서 강한 청색형광(blue fluorescence)을 나타내며 이러한 특성은 애기장대 식물체에서 트립토판 관련 돌연변이체를 확인하기 위한 표현형 마커로 사용되고 있다(Rose et al. 1992; Radwanski and Last 1995a; Radwanski et al. 1995b).

### Phosphoribosylanthranilate Transferase (PAT)

트립토판 생합성의 두 번째 효소인 phosphoribosylanthranilate transferase (PAT)는 phosphoribosylpyrophosphate의 phosphoribosyl 그룹을 anthranilate로 전달하여 5-phosphoribosylanthranilate를 생성시킨다. PAT 유전자는 애기장대에서 상시 발현하며, 처음 두 개의 인트론(intron)이 전사 후 mRNA 양을 증가시키는 것으로 나타났다(Rose and Last 1997a). 애기장대의 PAT1 유전자의 돌연변이체인 *trp1*는 anthranilate glucosides 축적에 따른 청색형광이 나타날 뿐만 아니라 크기 및 정단우세현상(apical dominance)이 줄어드는 옥신(auxin) 결핍 표현형을 나타낸다(Rose et al. 1997b). *trp1*의 옥신 결핍 표현형은 트립토판을 첨가하여도 회복되지 않는데, 이러한 결과는 트립토판 생합성경로와는 독립적인 옥신 생합성경로가 있음을 시사한다.

### Phosphoribosylanthranilate Isomerase (PAI)

Phosphoribosylanthranilate isomerase (PAI)는 5-phosphoribosylanthranilate에서 1-(*o*-carboxy-phenylamino)-1-deoxy-ribulose 5-phosphate (CdRP)로의 변환 반응을 촉매한다. 애기장대 Columbia 생태형은 3개의 PAI 유전자들을 지니고 있으며 이들 유전자의 발현 양상은 다양하다. 정상 생육 조건의 애기장대에서 PAI1과 PAI3는 PAI2보다 10배 높은 발현을 보일 뿐 아니라, 유전자의 발현은 UV광 조사, 질산염처리와 같은 환경 스트레스에 의해 조직 및 세포에 따라서 다르게 발현된다(Li et al. 1995b; He and Li 2001). 애기장

대의 *PAII* 유전자가 삭제(deletion)될 경우 비정상적인 성장이 관찰된다. 이것은 *PAII* 유전자가 트립토판 생합성에 핵심적 역할을 수행함을 나타낸다. 한편 애기장대 *Wassilewskija* 생태형은 4개의 *PAI* 유전자들을 지니며 그 중 *PAII*과 *PAI4*는 염색체상에 inverted repeats의 형태로 나란히 위치한다. 이러한 유전자 배열은 small RNA를 매개로 한 메틸화(methylation)를 촉발시키고 그에 따라 *PAI2* 유전자의 발현이 메틸화에 의해 억제된다(Bartee and Bender 2001; Melquist and Bender 2003). 기존의 트립토판 돌연변이체들과 마찬가지로, *PAI* 유전자 역방향 발현 식물체는 청색형광 표현형을 나타냈다. 각각의 *PAI* 유전자들의 트립토판 유래 인돌(indole) 화합물 생성에 미치는 기능은 추후에 밝혀져야 할 부분이다.

### Indole-3-Glycerol Phosphate Synthase (IGPS)

Indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS)는 CdRP의 indole-3-glycerol phosphate (IGP)로의 변환 반응을 촉매한다. IGPS는 indole ring을 만드는 유일한 효소로서, 트립토판과 옥신 생합성에서 중요한 반응 단계의 효소이다. 애기장대에서는 2개의 *IGPS* 유전자를 지니고 있으며 그 중 애기장대의 *IGPS1* 유전자를 발현억제 시키면 트립토판과 옥신이 모두 감소하는 반면, tryptophan synthase (TS)가 돌연변이 되었을 경우에는 트립토판은 감소되고 트립토판 유래 옥신의 합성은 증가되었다(Ouyang et al. 2000). 이러한 결과는 IGP가 트립토판과 트립토판 비유래 옥신 합성의 핵심 분기점임을 시사한다. 한편 곰팡이와 박테리아에서는 IGPS가 하나 또는 두 개의 다른 트립토판 생합성 효소들과 융합된 형태로 존재하는 반면, 식물에서는 일반적으로 단일기능성 효소로서 존재한다(Li et al. 1995a; 1995b). 애기장대의 IGPS 유전자는 자스몬산(jasmonic acid), 살리실산과 같은 호르몬뿐 아니라 다양한 방어기전에 의해 발현이 조절된다(Job et al. 2005; Sasaki-Sekimoto et al. 2005; Chibani et al. 2006; Rajjou et al. 2006; Dombrecht et al. 2007).

### Tryptophan Synthase (TS)

트립토판 생합성 경로의 마지막 두 단계 반응은 tryptophan synthase 알파 서브유닛(TS $\alpha$ )과 베타 서브유닛(TS $\beta$ )에 의해 일어난다. TS $\alpha$ 에 의해 IGP는 인돌(indole)과 glyceraldehyde 3-phosphate (G3P)로 분리되고, TS $\beta$ 는 인돌과 serine을 결합시킴으로써 트립토판을 생성한다(Barends et al. 2008). 애기장대의 기능적으로 검증된 TS $\alpha1$  외에도 65%의 아미노산 상동성을 나타내는 TS $\alpha$  homolog (At4g02610)는 특성 분석되어 indole synthase로 명명되었다. 애기장대의 기능적 TS $\beta$  유전자는 TS $\beta1$ 과 TS $\beta2$ 로 2개이며 그 외에 추정

상의 유전자가 2개 더 알려져 있다. 트립토판 생합성에서 TS $\alpha1$ 과 TS $\beta1$ 의 필수적 역할은 *trp3*와 *trp2* 돌연변이 각각의 트립토판 영양요구성(Trp auxotrophic) 표현형을 바탕으로 유전적으로 증명되었으며, 이들 유전자는  $\alpha_2\beta_2$  이형복합체(heterocomplex)를 형성함이 제시되었다(Radwanski et al. 1995b; Radwanski et al. 1996). 애기장대의 TS $\alpha1$  유전자는 대장균 돌연변이를 이용한 상보성 검정을 실시한 결과 단량체로 기능이 제시되었다(Bohmann et al. 1995; Radwanski and Last 1995a; Radwanski et al. 1995b). 그러나 단량체 또는 이형복합체로서의 TS 효소 기능에 대해서는 추가적 연구가 필요하다.

### 페닐알라닌 및 티로신 생합성

방향족 아미노산인 페닐알라닌과 티로신은 shikimate 경로의 최종산물인 chorismate로부터 합성된다. Chorismate는 chorismate mutase (CM)에 의해 prephenate로 변환되고, 이를 기질로 하여 2가지 대사경로로 페닐알라닌과 티로신이 생성된다. 하나는 arogenate 경로로서, prephenate를 L-arogenate로 변환한 후, arogenate dehydratase (ADT) 또는 arogenate dehydrogenase (ADH)에 의해 각각 탈수화(dehydration)/탈카르복실화(decarboxylation)을 거쳐 페닐알라닌을 생성하거나, 탈수소화(dehydrogenation)/탈카르복실화를 거쳐 티로신을 생성한다. 또 다른 경로는 phenylpyruvate와 4-hydroxyphenylpyruvate 경로로서, 각각 페닐알라닌과 티로신을 생성한다. Phenylpyruvate 경로에서는 prephenate가 prephenate dehydratase (PDT)에 의해 탈수화/탈카르복실화 되어 phenylpyruvate로 변환된 후, transamination 되어 페닐알라닌이 생성된다. 4-hydroxyphenylpyruvate 경로에서는 prephenate가 prephenate dehydrogenase (PDH)에 의해 탈수소화/탈카르복실화되어 4-hydroxyphenylpyruvate로 변환된 후, transamination 되어 티로신이 생성된다.

대부분의 미생물들은 페닐알라닌과 티로신 합성을 위해서 주로 phenylpyruvate 경로를 이용한다(Zamir et al. 1985). 식물의 페닐알라닌 합성의 경우에는 미생물과는 달리 arogenate 경로가 주요 경로임이 밝혀졌으며, 티로신 합성의 주요경로는 앞으로 규명되어야 할 것이다(Maeda et al. 2010). 식물에서의 방향족 아미노산인 페닐알라닌과 티로신의 생합성 경로가 정확하게 밝혀진다면 식물의 탄소 흐름의 분할과 그 조절에 대해 이해할 수 있을 것이다.

### Chorismate Mutase (CM)

Chorismate mutase (CM)는 페닐알라닌과 티로신 생합성의 첫 번째 반응인 chorismate의 prephenate로의 전환을 촉매한다. CM은 방향족 아미노산을 생산하는 여러 생물체에서 기능적, 구조적으로 다양한 형태로 존재한다. 자연계



에서 CM은 일반적인 단일기능성 효소 이외에도 *B. subtilis*의 CM-DAHPS 또는 대장균에서 발견된 CM-PDT, CM-PDH와 같은 상당수의 이중기능성 효소들로서 존재한다(Romero et al. 1995b). 단백질 구조를 바탕으로 CM 효소들은  $\alpha$ -helical 구조를 지닌 AroQ 타입과  $\alpha/\beta$ -원통형구조를 지닌 AroH 타입으로 분류 되어왔다(Chook et al. 1993; Lee et al. 1995). 대부분의 박테리아와 곰팡이, 식물의 CM 효소들은 AroQ 타입의 구조를 지니고 있다.

애기장대에서는 3개의 CM 유전자가 밝혀졌다. 이들은 대장균과, 효모의 CM-결핍 균주들에 대한 상보성 검정을 통해 CM 활성이 규명되었다(Eberhard et al. 1996). 이들 유전자들은 다양한 조직 내에서 서로 다른 양상으로 발현한다. *CM1*과 *CM3* 유전자의 발현은 다양한 유도인자(elicitor)와 병원균 처리에 의해서 유도된다(Mobley et al. 1999; Ehltung et al. 2005). 색소체 적중서열을 지닌 *CM1*과 *CM3*는 페닐알라닌과 티로신에 의해 활성이 억제되며 트립토판에 의해 활성화된다(Gilchrist et al. 1972; Kuroki and Conn 1989; Benesova and Bode 1992; Mobley et al. 1999). 최근 페튜니아 *CM1* 유전자 RNAi를 이용한 발현억제 연구를 통해 꽃잎의 페닐알라닌 유래 휘발성 물질인 페닐프로파노이드/벤젠노이드(benzenoids) 생성에 *CM1*이 관여한다는 것이 확인되었다(Colquhoun et al. 2010a).

한편 색소체 적중서열을 지니지 않은 *CM2*의 경우, 담배의 *CM2*는 세포질에 위치하나 아직 CM 효소활성도는 검증되지 않았으며 애기장대 *AtCM2*는 CM 효소활성도는 검증되었으나 아직 그 생리적 중요성은 파악되지 않고 있다(d'Amato et al. 1984; Eberhard et al. 1996; Rippert et al. 2009). 또한 토마토의 오직 하나뿐인 CM 효소는 세포질에 위치하는 것으로 보인다. 한편 이들 세포질의 CM 들은 방향족 아미노산에 의한 다른자리 입체성 조절을 받지 않는다(Eberhard et al. 1996).

최근 식물 종양을 유발하는 병원성 곰팡이인 *Ustilago maydis*를 포함하는 여러 미생물에서 chorismate mutase인 *Cmu1*을 분비한다는 연구결과가 보고되었다(Djamei et al. 2011). 병원균이 식물 세포 내로 침투하여 *Cmu1*을 분비하여 식물 방어 기작에 관여하는 살리실산 생합성의 전구체인 chorismate를 prephenate로 급격히 변환시킴으로써 살리실산 생합성을 감소시켜 식물체내로의 침투를 용이하게 하는 것으로 보여진다.

### Prephenate Aminotransferase (PPA-AT)

페닐알라닌과 티로신 생합성에서 arogenate 경로의 시작 단계 효소인 prephenate aminotransferase (PPA-AT)는 transamination 반응을 통해 prephenate로부터 arogenate를 생성한다. PPA-AT 효소활성은 그 동안 수행되어온 광범위한 생화학적 특성 분석에 의해 많은 식물종 뿐 아니라 몇몇 박테리아에서

도 검출되어왔다(Stenmark et al. 1974; Bonner and Jensen 1985; Maeda et al. 2011). 애기장대와 페튜니아, 토마토에서의 PPA-AT 유전자 규명을 통해 PPA-AT 효소들이 glutamate, aspartate, prephenate와 같은 dicarboxylic acid 기질들의 인식에 중요한 부위인 109번째 lysine을 지니는 class Ib aspartate aminotransferases (AT)에 속한다는 것이 밝혀졌으며 또한 식물 PPA-AT는 arogenate보다 prephenate에 대해 약 10배 높은 기질 친화도를 보임을 확인하였다(Nobe et al. 1998). 이것은 PPA-AT 효소들은 정반응을 촉매하여 prephenate로부터 arogenate로의 탄소흐름을 주도한다는 것을 나타낸다(Maeda et al. 2011; Dornfeld et al. 2014). 광범위한 기질 특이성을 보이는 대부분의 AT들과 마찬가지로, 종종 식물 PPA-AT 효소들은 aspartate AT 효소활성도 역시 나타낸다. 그러나, 페튜니아 꽃잎에서의 PPA-AT 유전자 RNAi 발현억제 시 aspartate AT 활성에는 영향을 미치지 않고 오직 PPA-AT 활성만 크게 감소하였다(Maeda et al. 2011). 이것은 PPA-AT 유전자의 단백질은 prephenate의 arogenate로의 변환이 주요 역할이며 식물의 전체 aspartate AT 활성에는 기여하는 바가 미미하다는 것을 나타낸다.

### Prephenate and Arogenate Dehydratases (PDT and ADT)

Prephenate dehydratase (PDT)는 페닐알라닌 생합성경로에서 phenylpyruvate 경로의 첫 번째 단계인 탈카르복실화와 탈가수화반응으로 prephenate의 phenylpyruvate로의 전환을 촉매한다. 반면 ADT는 arogenate 경로의 마지막 단계인 arogenate의 페닐알라닌으로의 전환을 촉매한다. PDT와 ADT 단백질들은 촉매도메인(catalytic domain)과 페닐알라닌에 의한 다른 자리 입체성 조절에 관여하는 C말단의 ACT (aspartokinase, chorismate mutase, TyrA) 조절도메인(regulatory domain)으로 구성된다. 곰팡이와 대부분의 박테리아들은 단일기능성의 PDT 또는 ADT 효소들을 지니는 반면, 대장균 같은 몇몇 진정세균들은 N말단에 CM과 융합된 이중기능성 CM-PDT (PheA) 효소를 지닌다(Kleeb et al. 2006).

식물 ADT 효소를 암호화하는 유전자는 박테리아 PDT들과의 상동성 검색을 통해, 애기장대에서는 6개, 벼에서는 6개, 페튜니아에서는 3개가 확인되었다. 이들 효소는 세포 내 위치조사에 의해 색소체에 위치하는 것으로 추정되었고, 기질로 prephenate가 아닌 arogenate를 선호하는 기질특이성을 나타냈다(Cho et al. 2007; Yamada et al. 2008; Maeda et al. 2010). 벼의 5-methyl-Trp 저항성 돌연변이인 *Mtr1*에서는 페닐알라닌과 트립토판, 그 외에 여러 페닐프로파노이드 물질들이 축적되었다. 이것은 벼의 ADT (또는 PDT) 활성을 지니는 유전자의 점돌연변이(point mutation)에 의해 페닐알라닌에 의한 피드백 저해가 일어나지 않기 때문인 것으로 보인다(Yamada et al. 2008). 한편 페튜니아에서 ADT 유전자의 RNAi 발현억제 시 페닐알라닌

의 합성이 약 80% 감소하였다. 이러한 결과는 페튜니아에서의 페닐알라닌의 합성은 주로 arogenate 경로를 통해 생성된다는 것을 나타낸다. 페튜니아 꽃에서 arogenate 경로의 PPA-AT와 ADT 효소활성도를 비교 분석한 결과 PPA-AT 효소활성도가 3배 이상 높다는 것이 관찰되었다 (Maeda et al. 2010; 2011). 이는 arogenate 경로를 통한 페닐알라닌 합성 시에 PPA-AT 보다는 ADT가 반응을 제한 단계(rate-limiting step)의 효소임을 나타낸다.

ADT 효소활성도는 다양한 식물 조직과 종에서 검출되어 온 반면 PDT 활성은 백화된 애기장대의 어린 식물체에서만 나타났다. 그러나 애기장대의 6개 ADT 중 3개 (ADT1, ADT2, ADT6)의 효소는 ADT 활성 뿐만 아니라 prephenate를 기질로 하여 phenylpyruvate를 생성하는 PDT 활성도 역시 지니는 것으로 확인되었다(Cho et al. 2007). 또한 최근에 페튜니아의 꽃잎에 shikimate를 처리하여 shikimate 경로로의 탄소 흐름을 증가시킬 경우 phenylpyruvate가 검출되며, 또한 ADT-RNAi 발현억제 형질전환 꽃잎에서 줄어들었던 페닐알라닌 함량이 shikimate 처리에 의해 복구됨이 확인되었다(Meada et al. 2010). 이와 더불어 많은 식물체에서 phenylpyruvate가 검출되고 이를 기질로 한 이차 대사산물인 phenylacetaldehyde, 2-phenylethanol 등이 검출된다는 사실은 비록 arogenate 경로가 식물 페닐알라닌 생합성의 주요 경로이지만 PDT 효소활성을 통한 phenylpyruvate 경로 또한 식물 페닐알라닌 생합성에 기여할 수 있음을 시사한다(Watanabe et al. 2002; Kaminaga et al. 2006).

*In situ* 현미경 분석의 결과는 애기장대의 모든 ADT 효소들이 색소체에 위치함을 보여준다(Rippert et al. 2009). 애기장대의 ADT3의 경우 heterotrimeric G-protein 복합체의 구성 단백질로서 plasma membrane에 존재하는 것으로 관찰되었다(Warpeha et al. 2006). 이와 같이 ADT는 특정 성장 단계나 생리적 조건에서 다른 단백질과의 복합체로써 관여할 수도 있음을 알 수 있다.

현재까지의 연구결과를 취합해 보면 식물은 주로 arogenate 경로를 통해서 페닐알라닌을 합성하게 되는데, 이러한 결과는 PPA-AT 효소활성에 기인한 것으로 생각된다. Arogenate 뿐만 아니라 prephenate 역시 기질로 사용할 수 있는 ADT 효소들은 prephenate 기질에 대해 PPA-AT 효소와 경쟁한다. 두 효소들 모두 prephenate에 대해 비슷한  $K_m$  값을 보이지만 PPA-AT들의 촉매효율이 ADT들 보다 50-250배 가량 높다(Cho et al. 2007; Yamada et al. 2008; Maeda et al. 2010). 이러한 PPA-AT의 높은 촉매 효율이 탄소 흐름을 prephenate로부터 arogenate 경로로 대사 흐름을 진행시키는 것으로 볼 수 있다.

#### Arogenate and Prephenate Dehydrogenases (ADH and PDH)

ADH와 PDH는 arogenate와 prephenate의 산화적 탈카르복

실화를 촉매하여 각각 티로신과 4-hydroxyphenylpyruvate를 생성한다. ADH와 PDH들은 사량체로써 활성을 나타내며 각각의 단량체들은 N말단 핵산결합부위와 C말단 기질결합부위를 지닌다(Legrand et al. 2006). 페닐알라닌 결합조절부위를 지닌 PDT, ADT들과는 달리 PDH와 ADH들은 독립적인 티로신 결합부위가 없고, 생성된 티로신에 의해 경쟁적으로 arogenate 기질에 대한 효소활성 저해를 받는다(Connelly and Conn 1986; Rippert and Matringe 2002; Legrand et al. 2006).

담배, 옥수수, 수수, 애기장대에서 arogenate를 티로신으로 변환시키는 ADH 활성이 검출되어 왔다. 반면 PDH 활성은 오직 콩류에서만 검출되어왔다(Rubin and Jensen 1979). 식물의 ADH 유전자들은 애기장대에서 2개와 옥수수에서 4개가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 애기장대 ADH는 모두 색소체에 위치한다(Rippert and Matringe 2002; Holding et al. 2010). 애기장대 효소들의 생화학적 특성분석 결과, ADH1이 arogenate에 대한 엄격한 기질 특이성을 보이는 반면 ADH2는 arogenate 뿐만 아니라 prephenate 또한 기질로 취할 수 있으나 arogenate에 비해 1000배 가량 낮은 촉매효율을 보였다(Rippert and Matringe 2002). 따라서 실제 PDH 활성에 의해 4-hydroxyphenylpyruvate를 경유하는 식물 티로신 생합성의 alternative 경로의 존재 여부는 추가적 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

ADH 효소의 식물체에서의 생체내 기능은 아직 명확하지 않으나, transposon 삽입을 통한 옥수수 ADH1 유전자 손상시 불투명 내배유의 표현형과 종자의 저장 단백질(zein) 감소가 나타나며 또한 자유 티로신 함량이 약간 감소되었는데, 이는 중복된 ADH 유전자들이 티로신 생합성에 영향을 미치거나 또 다른 티로신 생합성 경로가 존재하기 때문인 것으로 추측된다(Holding et al. 2010).

#### Phenylpyruvate and 4-Hydroxyphenylpyruvate Aminotransferases (PPY-AT and HPP-AT)

Phenylpyruvate aminotransferase (PPY-AT)는 phenylpyruvate의 transamination을 촉매하여 페닐알라닌을 생성한다. 이와 비슷한 방식으로, 4-hydroxyphenylpyruvate aminotransferase (HPP-AT)는 4-hydroxyphenylpyruvate을 티로신으로 변환시킨다. 애기장대에는 예측되는 8개의 티로신 aminotransferase 유전자들이 존재하며(Arabidopsis Genome Initiative 2000), 이중 두 개의 효소들은 생화학적 특성분석이 되어왔다(Lopukhina et al. 2001; Jones et al. 2003; Prabhu and Hudson 2010). 최근에 페튜니아의 arogenate 경로의 ADT와 PPA-AT 모두를 RNAi 발현억제 시킨 형질전환체에서 페닐알라닌의 생합성이 확인되었으며 이는 식물의 주된 페닐알라닌 생합성 경로인 arogenate 경로를 억제시키면 phenylpyruvate 경로를 통해 페닐알라닌이 합성될 수 있음을 나타낸다(Yoo et

al. 2013). 한편 phenylpyruvate 경로의 주된 효소로써 PPY-AT 들이 관여하는 것으로 밝혀졌다. 이들은 기존의 방향족 아미노산 효소의 색소체 적중서열을 지니지 않고 세포질 내에 위치하며 arogenate 경로가 제한되었을 때 식물체의 페닐알라닌 생성에 관여하는 것으로 보여진다(Yoo et al. 2013). 그러나 색소체에서 생성된 phenylpyruvate의 세포질로의 이동과 세포질의 페닐알라닌 생합성과 관련한 효소들에 대한 연구는 앞으로 진행되어야 할 것이다.

**Shikimate 및 방향족 아미노산 생합성 조절**

미생물과 식물은 방향족 아미노산 생합성으로의 탄소흐름을 전사와 전사 후 수준에서 조절한다(Bentley 1990). 식물은 단백질 생합성뿐 아니라 식물의 주요 세포벽 구성성분, 방어물질 및 기능성 천연물질 생성을 위해 방향족 아미노산 생합성을 조절한다. 기능성 천연물질은 특정한 발달 단계 및 환경적 조건에 따라 그 수준이 급격하게 변동한다. 따라서 식물의 방향족 아미노산 생합성 조절은 하위의 기능성 천연물질 대사경로의 활성화에 영향을 미치게 된다.

**전사 조절**

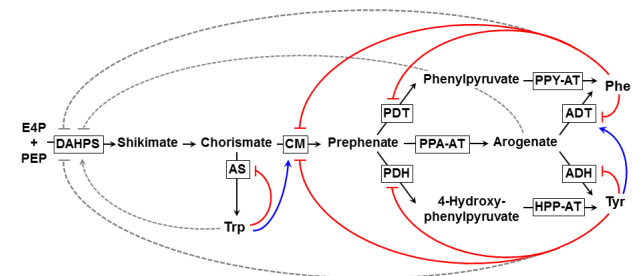
방향족 아미노산 생합성 효소들을 암호화하는 많은 유전자들은 발달 단계, 상처, 오존, 병원균 감염, elicitors 등과 같은 다양한 환경적 자극에 의해 그 발현이 조절된다(Entus et al. 2002; Devoto et al. 2005; Yan et al. 2007). 방향족 아미노산의 합성과 분해를 조절하는 전사인자의 규명은 공통의 스트레스 조건 및 공통 발현분석(co-expression analysis)을 통해서 이루어졌다. 예로, 방향족 아미노산인 페닐알라닌 유래의 이차 대사산물인 페닐프로파노이드 대사물질 함량의 증가는 페닐알라닌 생합성단계의 효소 활성 증가와 일치한다는 결과가 관찰되었다(Ramsay and Glover 2005; Lepiniec et al. 2006; Stracke et al. 2007). 한편 식물체에서 shikimate 및 방향족 아미노산 생합성 경로의 유전자 발현을 직/간접적으로 조절하는 것으로 보이는 여러 전사인자들이 확인되었다.

또한 방향족 아미노산 유래의 천연물질들의 생합성을 조절하는 많은 전사인자들이 규명되어왔으며 그 중 몇가지는 방향족 아미노산 생합성 유전자 발현을 조절한다. 트립토판 유래 이차 대사산물인 인돌글루코시놀레이트(indol glucosinolates)의 생합성 조절에는 *altered Trp regulation1 (ATRI)* 유전자가 관여하는 것으로 밝혀졌다(Malitsky et al. 2008). *ATRI* 유전자는 MYB계열의 전사인자인 MYB34로, 애기장대에서 과발현 시켰을 경우 shikimate 경로의 7단계 유전자중 6개의 유전자들(*DAHPS*, *DHQS*, *DHD-SDH*, *EPSPS*, *CS*)의 발현과 트립토판 생합성경로의 5개의 유전

자(*AS*, *PAT*, *PAI*, *IGPS*, *TS*)의 발현이 모두 증가하였다. 페닐알라닌 유래의 이차 대사물질의 생합성과 관련한 많은 전사인자들이 밝혀져 왔다. 세포벽 형성과 관련한 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1 (NST)의 경우, NST1과 NST3가 손상된 이중돌연변이체에서 페닐알라닌 생합성에 관여하는 유전자들의 발현이 감소되었다(Mitsuda et al. 2007). 또한 담배(*Nicotiana attenuate*)에서 초식동물(herbivores)에 대한 방어 기작에 필요한 페닐프로파노이드-폴리아민(polyamine) 결합체 생성과 관련한 *MYB8* 전사인자의 발현억제는 shikimate 경로의 모든 유전자들의 발현을 현저하게 감소시켰으며, 페닐프로파노이드-폴리아민 결합체의 생성을 저해시켰다(Kaur et al. 2010). 페닐프로파노이드계열의 향기물질인 휘발성 벤젠노이드(benzenoid) 합성과 관련한 페튜니아의 전사인자인 *ODORANTI (ODO1)* 유전자의 발현은 향기생성과 관련한 유전자의 발현을 증가시킬 뿐 아니라, shikimate 경로 및 방향족 아미노산 생합성 효소를 암호화하는 *DAHPS*, *EPSPS*, *CM* 유전자의 발현을 증가시켰다(Colquhoun et al. 2010b). 페튜니아 꽃에서 휘발성 향기물질의 시간적, 공간적 생성 및 배출에 관여하는 것으로 밝혀진 emission of benzenoid (EOBII) 전사인자의 발현억제 시 휘발성 물질 축적이 감소되었고, shikimate 경로의 *CS*, *CM* 유전자의 발현이 감소됨이 확인되었다(Spitzer-Rimon et al. 2010). 이러한 결과들은 다양한 천연 화합물 생성과 관련한 전사인자들이 shikimate 경로와 방향족 아미노산 생합성 유전자의 발현을 조절하는 방식을 보여준다. 이러한 전사인자에 의한 조절이 목적 유전자의 프로모터에 직접적 혹은 간접적으로 작용하는지의 여부는 앞으로 규명되어야 하며, 추가적인 전사인자들도 밝혀져야 할 것이다.

**전사 후 조절**

방향족 아미노산의 생산은 전사조절 이외에도 복잡한 전



**Fig. 3** Posttranscriptional regulation of the shikimate and aromatic amino acid biosynthesis pathways in plant. Enzyme abbreviations are written as in Figure 2. Solid blue arrows and solid red lines represent the positive and negative regulation, respectively. Dashed gray lines represent suggested, but not clearly proven

사 후 조절을 받음으로써 shikimate 경로와 방향족 아미노산 생성경로로의 탄소 흐름이 조절된다(Fig. 3).

shikimate 경로로의 첫 대사 흐름의 유입을 결정하는 DAHPS 효소활성은 미생물의 경우에는 방향족 아미노산이 해당 효소의 다른자리 입체성 조절부위에 결합함으로써 피드백 억제(feedback inhibition)를 나타내는 반면에, 식물의 경우 DAHPS 효소활성 조절 방식이 아직 명확하지 않다(Herrmann and Weaver 1999; Knaggs 2001). 단, 예외적으로 옥수수 싹과 완두콩잎에서의 DAHPS 효소활성은 트립토판과 티로신에 의해서 피드백 억제를 받는 반면, 당근과 감자에서는 트립토판에 의해서 활성화됨이 밝혀져 왔다(Graziana and Boudet 1980; Reinink and Borstlap 1982; Suzich et al. 1985; Pinto et al. 1986). 시금치와 녹두에서는 페닐알라닌 합성경로의 중간대사물질인 arogenate가 *in vitro* 상에서 DAHPS 효소활성을 저해했지만, 식물체내에서의 arogenate에 의한 피드백 억제 현상은 보고되지 않았다(Rubin and Jensen 1985; Doong et al. 1993).

식물체의 방향족 아미노산 생합성 경로에서는 AS, CM, ADT, ADH 효소활성이 피드백 억제에 의해 조절 받는 것으로 보고되고 있다(Jung et al. 1986; Siehl and Conn 1988; Romero et al. 1995a;1995b; Rippert and Matringe 2002; Yamada et al. 2008). 특히 트립토판과 페닐알라닌/티로신 경로로의 탄소흐름 분할은 분지효소인 AS와 CM 활성화와 밀접하게 연관되어 조절된다. 두 가지 효소 모두 기질인 chorismate에 대해 경쟁한다. AS와 CM은 각각의 대사경로의 최종산물인 트립토판, 페닐알라닌/티로신에 의해서 피드백 억제를 받는다. 또한 트립토판에 의해 CM이 활성화되어 트립토판 생합성에서 페닐알라닌/티로신 생합성으로의 방향전환이 일어난다. 마찬가지로, 페닐알라닌/티로신 생합성의 분지점에 위치하는 효소들인 ADT/ADH와 PDT/PDH는 각각 페닐알라닌과 티로신에 의해 피드백 억제를 받는다. 때로는 티로신 생합성에서 페닐알라닌 생합성으로의 방향전환을 위해 티로신이 ADT를 활성화시키기도 한다.

다양한 이차 대사산물의 전구체이자 주요 기능성 물질의 공급회로인 shikimate와 방향족 아미노산 생합성 경로에 대한 식물체내의 생합성 및 조절 기작 연구는 식물체내의 기능성 물질 생산을 이해하기 위한 필수적이고 중요한 정보를 제공할 것이다.

### Shikimate 및 방향족 아미노산 생합성 대사공학

Shikimate 및 방향족 아미노산 생합성 경로를 통해 생산되는 일차 대사물질은 기능성 이차 대사물질 생성을 위한 전구물질로 이용될 수 있기 때문에 아미노산의 생성 흐름과 조절 기작에 대한 연구는 앞으로도 필요하다.

현재까지 shikimate와 방향족 아미노산 대사경로의 유전자들을 대사공학적으로 적용해 하위 대사산물에 미치

는 효과에 대해 연구해온 사례는 Table 2와 같다. Shikimate 경로의 첫 번째 효소인 DAHPS 유전자를 이용한 애기장대, 토마토, 페튜니아로의 형질전환 연구의 경우, 방향족 아미노산에 의한 다른자리 입체성에 의한 피드백 억제를 막기 위해서 C말단의 다른자리 입체성 부위를 제거하였다(Tzin et al. 2012; 2013; Oliva et al. 2015). 형질전환된 애기장대에서는 shikimate 유래의 중간산물 뿐만 아니라, 페닐알라닌 유래의 페닐프로파노이드 물질들, 트립토판 유래의 글루코시놀레이트 및 옥신 등이 증가되었다. 토마토의 경우에는 페닐알라닌 유래의 향기물질이 크게 증가되었으나 반면 카로티노이드계 향기물질의 생산은 감소되었다. 흥미롭게도 후각실험결과 사람들이 선호하는 향기성분인 2-phenylethanol은 증가하고, 불쾌한 향과 관련이 있는 polyamine putrescine은 감소되었다. 페튜니아의 경우에는 꽃잎에서 페닐알라닌 함량이 증가되고, 벤젠노이드와 페닐프로파노이드 유래의 휘발성 물질들이 증가되었다. 이러한 결과들은 shikimate 유래의 대사산물의 증가는 연관된 다른 대사산물 생성에 영향을 미친다는 것을 보여준다.

한편 방향족 아미노산 대사경로의 주요 분지점 효소가 각각의 방향족 아미노산 대사에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되었다. 트립토판 생합성을 위한 첫 번째 분지점의 효소인 AS $\alpha$ 의 피드백 둔감형 효소를 담배, 콩, 벼 등에 과발현시킨 결과 자유 트립토판 수준이 10배-400배 이상 증가하였다(Cho et al. 2000; Tozawa et al. 2001; Zhang et al. 2001; Matsuda et al. 2005). 이러한 결과는 피드백 둔감형 AS $\alpha$ 의 과다발현이 트립토판 축적을 강화시킨다는 것을 보여준다. 트립토판의 축적 정도는 생물학적 시스템에 따라 달라진다. 애기장대의 트립토판 과다생산 형질전환체들에서는 페닐알라닌과 티로신 함량도 높게 나타났다(Ishihara et al. 2006). 이러한 결과는 고농도의 트립토판이 CM을 활성화시켜 페닐알라닌, 티로신 유래 이차 대사물질 생성에 영향을 미치는 것으로 보여진다. 피드백 둔감형 AS $\alpha$ 를 과발현시킨 벼 캘러스와 감자에서 살펴보면, 트립토판 유래의 이차 대사산물인 indole-3-acetic acid가 각각 57배와 39배 증가하였다(Matsuda et al. 2005; Morino et al. 2005). 반면 애기장대의 경우에는 트립토판의 함량이 200배 이상 증가하지만, 병원균 접종시 인돌글루코시놀레이트의 함량이 오직 2배 증가하였다(Ishihara et al. 2006). 이러한 결과는 트립토판 함량이 인돌글루코시놀레이트 생성의 주요 제한 요인이 아니라는 것을 보여준다. 따라서 트립토판 유래의 이차 대사산물을 증진시키려면, 트립토판 생합성 경로 유전자와 더불어서 목적 이차 대사산물과 관련한 대사경로 유전자를 동반 과발현하는 전략이 필요하다고 보여진다.

페닐알라닌/티로신 합성을 위한 첫 번째 단계인 chorismate로부터 prephenate를 경유하여 phenylpyruvate를 합성하는

**Table 2** Metabolic engineering for enhancing of aromatic amino acid-derived metabolites in plant

Target plant or tissue	Target gene	Origin of gene	Function of gene	Promoter	Strategy	Results	References
<i>Arabidopsis</i>	<i>AroG</i>	<i>E.coli</i>	Phe feedback-insensitive DHAPS enzyme activity	CaMV35S	overexpression	Increased shikimate intermediate metabolites, phenylalanine, tryptophan and broad classes of secondary metabolite, such as phenylpropanoids, glucosinolates, auxin and other hormone conjugates	Tzin et al. (2012)
Tomato	<i>AroG</i>	<i>E.coli</i>	Phe feedback-insensitive DHAPS enzyme activity	E8 fruit specific	overexpression	Increased shikimic acid, aromatic amino acids and improved tomato quality (flavor and aroma)	Tzin et al. (2013)
Petunia	<i>AroG</i>	<i>E.coli</i>	Phe feedback-insensitive DHAPS enzyme activity	CaMV35S	overexpression	Increased Phe and accumulated the level of fragrant benzenoid-phenylpropanoid volatiles in petal	Oliva et al. (2015)
Legume ( <i>Astragalus sinicus</i> )	<i>ASA2</i>	5-methyl-tryptophan (5MT)-resistant tobacco cell line	Trp feedback-insensitive ASA enzyme activity	CaMV35S	overexpression	Increased free Trp in leaves, stems and roots and exhibited 5-MT resistance activity	Cho et al. (2000)
Tobacco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	<i>ASA2</i>	5MT-resistant tobacco cell line	Trp feedback-insensitive ASA enzyme activity	Plastid 16S rRNA operon	overexpression	Normal phenotype and fertility Increased free Trp in leaves and total Trp levels in seeds and exhibited 5-MT resistance activity	Zhang et al. (2001)
<i>Arabidopsis</i>	<i>OAS1</i> (D323N)	Rice ( <i>Oryza sativa</i> )	Trp feedback-insensitive ASA enzyme activity	CaMV35S	overexpression	Increased free Trp in seedling, and Phe and Tyr in leaves and roots Enhanced indol-3-ylmethyl glucosinolate Reduced phenylpropanoids and flavonoids	Ishihara et al. (2006)
Potato ( <i>Solanum tuberosum</i> )	<i>OAS1</i> (D323N)	Rice	Trp feedback-insensitive ASA enzyme activity	CaMV35S	overexpression	Increased free Trp and IAA contents in the upper part of the shoot	Matsuda et al. (2005)
Rice	<i>OAS1</i> (D323N)	Rice	Trp feedback-insensitive ASA enzyme activity	maize ubiquitin 1 gene (Ubi1)	overexpression	Increased free Trp in calli and leaves of seedling and exhibited 5-MT resistance activity	Tozawa et al. (2001)
				Ubi1	overexpression	Increased free Trp, IAA and indole-alkaloid glucoside	Morino et al. (2005)
<i>Arabidopsis</i>	<i>PheA</i>	<i>E.coli</i>	CM/PDT bifunctional enzyme activity	CaMV35S	overexpression	Accumulated Phe and Tyr-derived metabolites Reduced Trp-derived metabolites	Tzin et al. (2009)
Tobacco	<i>Tyr1</i>	Yeast ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Tyr feedback-insensitive PDH enzyme activity	duplicated of <i>Arabidopsis</i>	Co-expression	Increased tocotrienol and resistance toward the herbicidal HPPD inhibitor diketonitril	Rippert et al. (2004)
	<i>AtHPPD</i>	p-hydroxy phenyl pyruvate dioxygenase enzyme activity	Catalyzed enzyme for final step in homogentisate synthesis	Histone gene <i>H4748</i>			

박테리아의 이중기능성 효소인 CM/PDT를 페닐알라닌에 의한 피드백 억제현상을 차단하기 위해 CM/PDT의 다른 자리 입체성 조절부위를 제거하여 애기장대에서 과발현

시켰을 경우, 형질전환체에서 대조구 식물체에 비해 100배 가량 페닐알라닌 함량이 증가되었다(Tzin et al. 2009). 이것은 도입된 박테리아 효소에 의해 만들어진 phenylpyruvate

를 페닐알라닌으로 변환시키는 내재적 aminotransferase 활성을 애기장대가 지니고 있음을 나타낸다. 또한 형질 전환체에서는 페닐알라닌유래 또는 티로신유래의 대사 산물들인 페닐프로파노이드 및 비타민 E 등이 증가되었으며 반면, 트립토판유래의 이차 대사산물들은 감소되었다. 이러한 결과는 피드백 둔감형 CM/PDT에 의해서 chorismate가 페닐알라닌 생합성에 다량으로 사용되면서 트립토판 생합성을 위한 기질공급이 제한되었기 때문이라고 추측된다.

식물체내의 페닐알라닌과 티로신의 생합성은 aroenate 수준에서 나누어진다. 일반적으로 페닐프로파노이드계 물질 생성을 위해 페닐알라닌 생합성 쪽으로 탄소흐름이 치우치는 양상을 나타내고, 적은 양의 탄소가 티로신 생합성 쪽으로 유입되어 비타민 E의 전구체인 4-hydroxyphenylpyruvate로 변환된다(Rippert et al. 2004). 비타민 E의 생산을 목적으로 4-hydroxyphenylpyruvate로의 대사흐름을 증가시키기 위해서 효모유래의 티로신 비민감성 PDH 유전자를 담배의 색소체에서 발견시킨 결과 prephenate가 4-hydroxyphenylpyruvate로 변환되었으나 미량의 tocotrienols가 축적되었다. 반면 4-hydroxyphenylpyruvate를 homogentisate로 변환시키는 애기장대의 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD)를 티로신 비민감성 효모 PDH와 공동발현 시켰을 경우에는 다량의 tocotrienols가 축적되었다. 이전의 연구 결과에서는 애기장대의 HPPD 유전자를 단독으로 과발현시킨 경우엔 tocopherol 생산이 제한적이었다고 보고되었다(Tsegaye et al. 2002; Falk et al. 2003). 이와 같이 식물체내 비타민 E 축적을 위해서는 전구물질인 4-hydroxyphenylpyruvate의 충분한 공급을 위한 PDH와 homogentisate로의 변환을 위한 HPPD의 발현이 동시에 충족되어야 한다는 것이 확인되었다.

결론적으로, 방향족 아미노산유래의 기능성 이차 물질 생산을 위한 대사공학을 위해서는 피드백 비민감성 효소들을 발현시킴으로써 전사 후 억제조절을 배제시켜 방향족 아미노산 생산을 증가시키는 전략과 더불어서 유용 이차 대사물질의 보다 효과적인 대량생산을 위해서는 해당 물질의 생합성 유전자의 과다발현이 동반되어야 할 것이다.

## 적 요

식물의 페닐알라닌, 티로신, 그리고 트립토판과 같은 방향족 아미노산은 단백질 합성의 구성 성분 뿐만 아니라 다양한 이차 대사물질들의 전구물질들이다. 이러한 방향족 아미노산 유래의 화합물들은 식물의 색소와 세포벽 구성성분을 포함하는 다양한 페놀릭 화합물들의 구성성분이자, 옥신과 살리실산과 같은 식물 호르몬으로써 중

요한 역할을 수행한다. 또한 이들은 인간의 영양과 건강을 증진하는 높은 잠재력을 지니는 알칼로이드 및 글루코시놀레이트와 같은 천연산물로써 역할을 한다. 방향족 아미노산의 생합성경로는 shikimate 경로로부터 유래되는 공통의 중간기질인 chorismate를 공유한다. 트립토판은 중간기질로 anthranilate를 통해 합성되고, 페닐알라닌 및 티로신은 중간기질인 prephenate를 통해 합성된다. 본 논문에서는 방향족 아미노산 생합성경로에 관련한 모든 단계의 효소와 전사/전사후 수준에서의 그들의 유전자 조절에 대한 최근 연구들에 대해 종합적으로 되짚어 보면서, 추가적으로 식물의 방향족 아미노산 유래의 천연물질 생산을 증진시키기 위해 그 동안 시도되어온 대사공학적 노력들에 대해서 소개하고자 한다.

## Acknowledgements

This work was supported by a fund from the National Academy of Agricultural Science (PJ010027022015), Rural Development Administration, Republic of Korea.

## References

- Anton IA, Coggins JR (1988) Sequencing and overexpression of the *Escherichia coli aroE* gene encoding shikimate dehydrogenase. *Biochem J* 249:319-326
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815
- Barends TRM, Dunn MF, Schlichting I (2008) Tryptophan synthase, an allosteric molecular factory. *Curr Opin Chem Biol* 12:593-600
- Bartee L, Bender J (2001) Two *Arabidopsis* methylation-deficiency mutations confer only partial effects on a methylated endogenous gene family. *Nucleic Acids Res* 29:2127-2134
- Basset G, Quinlivan E, Ravel S, Rebeille F, Nichols B, Shinozaki K, Seki M, Adams-Phillips L, Giovannoni J, Gregory J, Hanson A (2004) Folate synthesis in plants: the *p*-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1496-1501
- Benesova M, Bode R (1992) Chorismate mutase isoforms from seeds and seedlings of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 31:2983-2987
- Benfey PN, Chua NH (1989) Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244:174-181
- Bentley R (1990) The shikimate pathway a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25:307-384
- Bischoff M, Rösler J, Raesecke HR, Görlach J, Amrhein N, Schmid J (1996) Cloning of a cDNA encoding a 3-dehydroquinate synthase from a higher plant, and analysis of the organ-specific

- and elicitor-induced expression of the corresponding gene. *Plant Mol Biol* 31:69-76
- Bischoff M, Schaller A, Bieri F, Kessler F, Amrhein N, Schmid J (2001) Molecular characterization of tomato 3-dehydroquinate dehydratase-shikimate: NADP oxidoreductase. *Plant Physiol* 125:1891-1900
- Bohlmann J, DeLuca V, Eilert U, Martin W (1995) Purification and cDNA cloning of anthranilate synthase from *Ruta graveolens*: modes of expression and properties of native and recombinant enzymes. *Plant J* 7:491-501
- Bonner CA, Jensen RA (1985) Novel features of prephenate aminotransferase from cell cultures of *Nicotiana glauca*. *Arch Biochem Biophys* 238:237-246
- Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, Job D, Jullien M, Grappin P (2006) Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 142:1493-1510
- Cho HJ, Brotherton JE, Song HS, Widholm JM (2000) Increasing tryptophan synthesis in a forage legume *Astragalus sinicus* by expressing the tobacco feedback-insensitive anthranilate synthase (ASA2) gene. *Plant Physiol* 123:1069-1076
- Cho M, Corea O, Yang H, Bedgar D, Laskar D, Anterola A, Moog-Anterola F, Hood R, Kohalmi S, Bernards M, Kang C, Davin L, Lewis N (2007) Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* identification and characterization of Arogenate dehydratases. *J Biol Chem* 282:30827-30835
- Chook YM, Ke H, Lipscomb WN (1993) Crystal structures of the monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis* and its complex with a transition state analog. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8600-8603
- Colquhoun TA, Schimmel BCJ, Kim JY, Reinhardt D, Cline K, Clark DG (2010a) A petunia chorismate mutase specialized for the production of floral volatiles. *Plant J* 61:145-155
- Colquhoun TA, Verdonk JC, Schimmel BC, Tieman DM, Underwood BA, Clark DG (2010b) Petunia floral volatile benzenoid/phenylpropanoid genes are regulated in a similar manner. *Phytochem* 71:158-167
- Connelly JA, Conn EE (1986) Tyrosine biosynthesis in *Sorghum bicolor*: isolation and regulatory properties of arogenate dehydrogenase. *Z Naturforsch C* 41:69-78
- d'Amato T, Ganson R, Gaines C, Jensen R (1984) Subcellular localization of chorismate-mutase isoenzymes in protoplasts from mesophyll and suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Planta* 162:104-108
- Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang H, Chilcott C, Zhu T, Turner J (2005) Expression profiling reveals *COII* to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* 58:497-513
- Ding L, Hofius D, Hajirezaei M-R, Fernie AR, Börnke F, Sonnewald U (2007) Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. *J Exp Bot* 58:2053-2067
- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, Feussner K, Meinicke P, Stierhof YD, Schwarz H, Macek B, Mann M, Kahmann R (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478:395-398
- Dombrecht B, Xuea GP, Spragueb SJ, Kirkegaardb JA, Rossc JJ, Reidc JB, Fittid GP, Sewelama N, Schenke PM, Mannersa JM, Kazana K (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:2225-2245
- Doong RL, Ganson RJ, Jensen RA (1993) Plastid-localized 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (DS-Mn): the early-pathway target of sequential feedback inhibition in higher plants. *Plant Cell Environ* 16:393-402
- Dornfeld C, Weisberg AJ, Ritesh KC, Dudareva N, Jelesko JG, Maeda HA (2014) Phylobiochemical characterization of class-Ib aspartate/prephenate aminotransferases reveals evolution of the plant arogenate phenylalanine pathway. *Plant Cell* 26:3101-3114
- Duncan K, Edwards RM, Coggins JR (1987) The pentafunctional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains. *Biochem J* 246:375-386
- Dyer WE, Weaver LM, Zhao JM, Kuhn DN, Weller SC, Herrmann KM (1990) A cDNA encoding 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Solanum tuberosum* L. *J Biol Chem* 265:1608-1614
- Eberhard J, Ehrlert TT, Epple P, Felix G, Raesecke HR, Amrhein N, Amrhein J (1996) Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties. *Plant J* 10:815-821
- Ehltling J, Mattheus N, Aeschliman DS, Li E, Hamberger B, Cullis IF, Zhuang J, Kaneda M, Mansfield SD, Samuels L, Ritland K, Ellis BE, Bohlmann J, Douglas CJ (2005) Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J* 42:618-640
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8:978-984
- Entus R, Poling M, Herrmann KM (2002) Redox regulation of *Arabidopsis* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Physiol* 129:1866-1871
- Falk J, Andersen G, Kernebeck B, Krupinska K (2003) Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Lett* 540:35-40
- Fiedler E, Schultz G (1985) Localization, purification, and characterization of shikimate oxidoreductase dehydroquinate hydrolyase from stroma of spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 79:212-218
- Forlani G, Parisi B, Nielsen E (1994) 5-Enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from *Zea mays* cultured cells (purification and properties). *Plant Physiol* 105:1107-1114
- Fucile G, Garcia C, Carlsson J, Sunnerhagen M, Christendat D (2011) Structural and biochemical investigation of two *Arabidopsis* shikimate kinases: The heat-inducible isoform is

- thermostable. *Protein Sci* 20:1125–1136
- Funke T, Han H, Healy-Fried ML, Fischer M, Schönbrunn E (2006) Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:13010–13015
- Galili G, Hoefgen R (2002) Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. *Metab Eng* 4:3–11
- Garg B, Vaid N, Tuteja N (2014) *In-silico* analysis and expression profiling implicate diverse role of *EPSPS* family genes in regulating developmental and metabolic processes. *BMC Res Notes* 7:58
- Gasser CS, Winter JA, Hironaka CM, Shah DM (1988) Structure, expression, and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato. *J Biol Chem* 263:4280–4287
- Gilchrist DG, Woodin TS, Johnson ML, Kosuge T (1972) Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in higher plants: I. Evidence for a regulatory form of chorismate mutase in etiolated mung bean seedlings. *Plant Physiol* 49:52–57
- Gorlach J, Raesecke H, Rentsch D, Regenass M, Roy P, Zala M, Kell C, Boller T, Amrhein N, Schmid J (1995) Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3166–3170
- Gorlach J, Schmid J, Amrhein N (1993) Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes. II. Chorismate synthase. *Plant Mol Biol* 23:707–716
- Gross J, Cho WK, Lezhneva L, Falk J, Krupinska K, Shinozaki K, Seki M, Herrmann RG, Meurer J (2006) A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. *J Biol Chem* 281:17189–17196
- Hamberger B, Ehltng J, Barbazuk B, Douglas CJ (2006) Comparative genomics of the shikimate pathway in *Arabidopsis*, *Populus trichocarpa* and *Oryza sativa*: shikimate pathway gene family structure and identification of candidates for missing links in phenylalanine biosynthesis. *Recent Adv Phytochem* 40:85–113
- He Y, Li J (2001) Differential expression of triplicate phosphoribosylanthranilate isomerase isogenes in the tryptophan biosynthetic pathway of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 212:641–647
- Herrmann KM, Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:473–503
- Holding DR, Meeley RB, Hazebroek J, Selinger D, Gruis F, Jung RF, Larkins BA (2010) Identification and characterization of the maize arogenate dehydrogenase gene family. *J Exp Bot* 61:3663–3673
- Huang L, Montoya AL, Nester EW (1975) Purification and characterization of shikimate kinase enzyme activity in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 250:7675–7681
- Hughes EH, Hong SB, Gibson SI, Shank JV, San KY (2004) Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. *Metab Eng* 6:268–276
- Huisman OC, Kosuge T (1974) Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in higher plants. II. 3-deoxy-*arabino*-heptulosonic acid 7-phosphate synthetase from cauliflower. *J Biol Chem* 249:6842–6848
- Huynb QK, Kisbore GM, Bild GS (1998) 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*: identification of Lys-22 as a potential active site residue. *J Biol Chem* 263:735–739
- Ishihara A, Asada Y, Takahashi Y, Yabe N, Komeda Y, Nishioka T, Miyagawaa H, Wakasab K (2006) Metabolic changes in *Arabidopsis thaliana* expressing the feedback-resistant anthranilate synthase alpha subunit gene *OAS1D*. *Phytochemistry* 67:2349–2362
- Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D (2005) Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* 138:790–802
- Jones PR, Manabe T, Awazuhara M, Saito K (2003) A new member of plant CS-lyases: a cystine lyase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278:10291–10296
- Jung E, Zamir LO, Jensen RA (1986) Chloroplasts of higher plants synthesize L-phenylalanine via L-arogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7231–7235
- Kaminaga Y, Schnepf J, Peel G, Kish CM, Ben-Nissan G, Weiss D, Orlova I, Lavie O, Rhodes D, Wood K, Porterfeld DM, Cooper AJ, Schloss JV, Pichersky E, Vainstein A, Dudareva N (2006) Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation. *J Biol Chem* 281:23357–23366
- Kasai K, Kanno T, Akita M, Ikejiri-Kanno Y, Wakasa K, Tozawa Y (2005) Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during panicle development and of the enzymatic activities of the encoded proteins. *Planta* 222:438–447
- Kaur H, Heinzl N, Schöttner M, Baldwin IT, Galis I (2010) R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol* 152:1731–1747
- Keith B, Dong X, Ausubel F, Fink G (1991) Differential induction of 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8821–8825
- Kim H, van Oostende C, Basset G, Browse J (2008) The *AAE14* gene encodes the *Arabidopsis* o-succinylbenzoyl-CoA ligase that is essential for phyloquinone synthesis and photosystem-I function. *Plant J* 54:272–283
- Klee HJ, Muskopf YM, Gasser CS (1987) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate tolerant plants. *Mol Gen Genet* 210:437–442
- Kleeb AC, Kast P, Hilvert D (2006) A monofunctional and thermostable prephenate dehydratase from the archaeon *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry* 45:14101–14110
- Knaggs AR (2001) The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep* 18:334–355
- Kriechbaumer V, Weigang L, Fiesselmann A, Letzel T, Frey M,



- Gierl A, Glawischnig E (2008) Characterisation of the tryptophan synthase alpha subunit in maize. *BMC Plant Biol* 8:44
- Kuroki GW, Conn EE (1989) Differential activities of chorismate mutase isozymes in tubers and leaves of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol* 89:472–476
- Lee AY, Karplus PA, Ganem B, Clardy J (1995) Atomic structure of the buried catalytic pocket of *Escherichia coli* chorismate mutase. *J Am Chem Soc* 117:3627–3628
- Legrand P, Dumas R, Seux M, Rippert P, Ravelli R, Ferrer JL, Matringe M (2006) Biochemical characterization and crystal structure of *Synechocystis* arogenate dehydrogenase provide insights into catalytic reaction. *Structure* 14:767–776
- Leonard E, Runguphan W, O'Connor S, Prather KJ (2009) Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production. *Nat Chem Biol* 5:292–300
- Lepiniec L, Debeaujon L, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol* 57:405–430
- Li J, Last RL (1996) The *Arabidopsis thaliana* *trp5* mutant has a feedback-resistant anthranilate synthase and elevated soluble tryptophan. *Plant Physiol* 110:51–59
- Li J, Zhao J, Rose AB, Schmidt R, Last RL (1995b) Arabidopsis phosphoribosylanthranilate isomerase: molecular genetic analysis of triplicate tryptophan pathway genes. *Plant Cell* 7:447–461
- Li J, Chen S, Zhu L, Last RL (1995a) Isolation of cDNAs encoding the tryptophan pathway enzyme indole-3-glycerol phosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 108(1): 877–878
- Lopukhina A, Dettenberg M, Weiler EW, Holl'ander-Czytko H (2001) Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126:1678–1687
- Macheroux P, Schmid J, Amrhein N, Schaller A (1999) A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta* 207:325–334
- Maclean J, Ali S (2003) The structure of chorismate synthase reveals a novel flavin binding site fundamental to a unique chemical reaction. *Structure* 11:1499–1511
- Maeda H, Dudareva N (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 63:73–105
- Maeda H, Shasany AK, Schnepf J, Orlova I, Taguchi G, Cooperd BR, Rhodesa D, Picherskyc E, Dudareva N (2010) RNAi suppression of *Arogenate Dehydratase1* reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in petunia petals. *Plant Cell* 22:832–849
- Maeda H, Yoo H, Dudareva N (2011) Prephenate aminotransferase directs plant phenylalanine biosynthesis via arogenate. *Nat Chem Biol* 7:19–21
- Malitsky S, Blum E, Less H, Venger I, Elbaz M, Morin S, Eshed Y, Aharoni A (2008) The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiol* 148:2021–2049
- Matsuda F, Yamada T, Miyazawa H, Miyagawa H, Wakasa K (2005) Characterization of tryptophan overproducing potato transgenic for a mutant rice anthranilate synthase alpha-subunit gene (*OASA1D*). *Planta* 222:535–545
- Melquist S, Bender J (2003) Transcription from an upstream promoter controls methylation signaling from an inverted repeat of endogenous genes in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 17:2036–2047
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozakib K, Ohme-Takagia M (2007) NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:270–280
- Mobley E, Kunkel B, Keith B (1999) Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 240:115–123
- Morino K, Matsuda F, Miyazawa H, Sukegawa A, Miyagawa H, Wakasa K (2005) Metabolic profiling of tryptophan-overproducing rice calli that express a feedback-insensitive alpha subunit of anthranilate synthase. *Plant Cell Physiol* 46:514–521
- Morollo AA, Eck MJ (2001) Structure of the cooperative allosteric anthranilate synthase from *Salmonella typhimurium*. *Nat Struct Biol* 8:243–247
- Mousdale DM, Coggins JR (1986) Detection and subcellular localization of a higher plant chorismate synthase. *FEBS Lett* 205:328–332
- Niyogi KK, Fink GR (1992) Two anthranilate synthase genes in *Arabidopsis*: defense-related regulation of the tryptophan pathway. *Plant Cell* 4:721–733
- Nobe Y, Kawaguchi S, Ura H, Nakai T, Hirotsu K, Kato R, Kuramitsu S (1998) The novel substrate recognition mechanism utilized by aspartate aminotransferase of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *J Biol Chem* 273:29554–29564
- Oliva M, Ovadia R, Perl A, Bar E, Lewinsohn E, Galili G, Shamir MO (2015) Enhanced formation of aromatic amino acids increases fragrance without affecting flower longevity or pigmentation in *Petunia × hybrida*. *Plant J* 13:125–136
- Ouyang J, Shao X, Li J (2000) Indole-3-glycerol phosphate, a branch point of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 24:327–333
- Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, Rajani S, Mayalagu S, Johnson CS, Capron A, Xie LF, Ye D, Sundaresan V (2005) Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* 132:603–614
- Pingsha H, Yan H, Roger PW (2009) Functional contribution of chorismate synthase, anthranilate synthase, and chorismate mutase to penetration resistance in barley–powdery mildew interactions. *MPMI* 22:311–320
- Pinto JE, Suzich JA, Herrmann KM (1986) 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol* 82:1040–1044
- Prabhu PR, Hudson AO (2010) Identification and partial charac-

- terization of an L-tyrosine aminotransferase (TAT) from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Res Int* 2010:549-572
- Quevillon-Cheruel S, Leulliot N, Meyer P, Graille M, Bremang M, Blondeau K, Sorel I, Poupon A, Janin J, van Tilbeurgh H (2004) Crystal structure of the bifunctional chorismate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279:619-625
- Radwanski ER, Barczak AJ, Last RL (1996) Characterization of tryptophan synthase alpha subunit mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 253:353-361
- Radwanski ER, Last RL (1995a) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7:921-934
- Radwanski ER, Zhao J, Last RL (1995b) *Arabidopsis thaliana* tryptophan synthase alpha: gene cloning, expression, and subunit interaction. *Mol Gen Genet* 248:657-667
- Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D (2006) Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol* 141:910-923
- Ramsay NA, Glover BJ (2005) MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* 10:63-70
- Reinink M, Borstlap AC (1982) 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from pea leaves: inhibition by L-tyrosine. *Plant Sci Lett* 26:167-171
- Rippert P, Matringe M (2002) Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269:4753-4761
- Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M (2004) Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiol* 134:92-100
- Rippert P, Puyaubert J, Grisolle D, Derrier L, Matringe M (2009) Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149:1251-1260
- Romero RM, Roberts MF, Phillipson JD (1995a) Anthranilate synthase in microorganisms and plants. *Phytochemistry* 39: 263-276
- Romero RM, Roberts MF, Phillipson JD (1995b) Chorismate mutase in microorganisms and plants. *Phytochemistry* 40: 1015-1025
- Rose A, Casselman A, Last RL (1992) A phosphoribosylanthranilate transferase gene is defective in blue fluorescent *Arabidopsis thaliana* tryptophan mutants. *Plant Physiol* 100:582-592
- Rose AB, Last RL (1997a) Introns act post-transcriptionally to increase expression of the *Arabidopsis thaliana* tryptophan pathway gene *PAT1*. *Plant J* 11:455-464
- Rose AB, Li J, Last RL (1997b) An allelic series of blue fluorescent *trp1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 145:197-205
- Rubin JL, Jensen RA (1979) Enzymology of L-tyrosine biosynthesis in mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek). *Plant Physiol* 64:727-734
- Rubin JL, Jensen RA (1985) Differentially regulated isozymes of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from seedlings of *Vigna radiata* [L.] Wilczek. *Plant Physiol* 79:711-718
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Ohta H (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defense compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 44:653-668
- Schaller A, Schmid J, Leibinger U, Amrhein N (1991a) Molecular cloning and analysis of a cDNA coding for chorismate synthase from the higher plant *Corydalis sempervirens* Pers. *J Biol Chem* 266:21434-21438
- Schaller A, van Afferden M, Windhofer V, Bülow S, Abel G, Schmid J, Amrhein N (1991b) Purification and characterization of chorismate synthase from *Euglena gracilis*: comparison with chorismate synthases of plant and microbial origin. *Plant Physiol* 97:1271-1279
- Schmid J, Schaller A, Leibinger U, Boll W, Amrhein N (1992) The *in-vitro* synthesized tomato shikimate kinase precursor is enzymatically active and is imported and processed to the mature enzyme by chloroplasts. *Plant J* 2:375-383
- Siehl DL, Conn EE (1988) Kinetic and regulatory properties of arogenate dehydratase in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch Biochem Biophys* 260:822-829
- Singh SA, Christendat D (2006) Structure of *Arabidopsis* dehydroquinase dehydratase-shikimate dehydrogenase and implications for metabolic channeling in the shikimate pathway. *Biochemistry* 45:7787-7796
- Spitzer-Rimon B, Marhevka E, Barkai O, Marton I, Edelbaum O, Masci T, Prathapani NK, Shklarman E, Ovadis M, Vainstein A (2010) *EOB1*, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia. *Plant Cell* 22:1961-1976
- Stenmark SL, Pierson DL, Jensen RA, Glover GI (1974) Blue-green bacteria synthesise L-tyrosine by the pre-tyrosine pathway. *Nature* 247:290-292
- Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K, Weisshaar B (2007) Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant J* 50:660-677
- Suzich JA, Dean JF, Herrmann KM (1985) 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from carrot root (*Daucus carota*) is a hysteretic enzyme. *Plant Physiol* 79:765-770
- Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie AR (2013) Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Front Plant Sci* 4:62
- Tozawa Y, Hasegawa H, Terakawa T, Wakasa K (2001) Characterization of rice anthranilate synthase alpha-subunit genes *OAS1* and *OAS2*: tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback-insensitive mutant of *OAS1*. *Plant Physiol* 126:1493-1506
- Tsegaye Y, Shintani DK, DellaPenna D (2002) Overexpression of the enzyme *p*-hydroxyphenolpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol Biochem* 40:913-920

- Tzin V, Galili G (2010) New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol Plant* 3:956-972
- Tzin V, Malitsky S, Aharoni A, Galili G (2009) Expression of a bacterial bi-functional chorismate mutase/prephenate dehydratase modulates primary and secondary metabolism associated with aromatic amino acids in *Arabidopsis*. *Plant J* 60:156-167
- Tzin V, Malitsky S, Ben Zvi MM, Bedair M, Sumner L, Aharoni A, Galili G (2012) Expression of a bacterial feedback-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of the shikimate pathway in *Arabidopsis* elucidates potential metabolic bottlenecks between primary and secondary metabolism. *New Phytologist* 194:430-439
- Tzin V, Rogachev I, Meir S, Ben Zvi MM, Masci T, Vainstein A, Aharoni A, Galili G (2013) Tomato fruits expressing a bacterial feedback-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of the shikimate pathway possess enhanced levels of multiple specialized metabolites and upgraded aroma. *J Exp Bot* 64:4441-4452
- Waller JC, Akhtar TA, Lara-Nunez A, Gregory JF 3rd, McQuinn RP, Giovannoni JJ, Hanson AD (2010) Developmental and feed forward control of the expression of folate biosynthesis genes in tomato fruit. *Mol Plant* 3:66-77
- Wang W, Xia H, Yang X, Xu T, Si HJ, Cai XX, Wang F, Su J, Snow AA, Lu BB (2014) A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase transgene for glyphosate resistance stimulates growth and fecundity in weedy rice (*Oryza sativa*) without herbicide. *New Phytologist* 202:679-688
- Warpeha KM, Lateef SS, Lapik Y, Anderson M, Lee BS, Kaufman LS (2006) G-protein-coupled receptor 1, G-protein  $\alpha$ -subunit 1, and prephenate dehydratase 1 are required for blue light-induced production of phenylalanine in etiolated *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140:844-855
- Watanabe S, Hayashi K, Yagi K, Asai T, MacTavish H, Picone J, Turnbull C, Watanabe N (2002) Biogenesis of 2-phenylethanol in rose flowers: incorporation of [ $^2\text{H}_8$ ]L-phenylalanine into 2-phenylethanol and its  $\beta$ -D-glucopyranoside during the flower opening of *Rosa* 'Hoh-Jun' and *Rosa damascena* Mill. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:943-947
- Wildermuth M, Dewdney J, Wu G, Ausubel F (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature* 414:562-565
- Wu J, Woodard RW (2006) New insights into the evolutionary links relating to the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase subfamilies. *J Biol Chem* 281:4042-4048
- Yamada T, Matsuda F, Kasai K, Fukuoka S, Kitamura K, Tozawa Y, Miyagawa H, Wakasa K (2008) Mutation of a rice gene encoding a phenylalanine biosynthetic enzyme results in accumulation of phenylalanine and tryptophan. *Plant Cell* 20:1316-1329
- Yan Y, Stolz S, Chetelat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, Farmer EE (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19:2470-2483
- Yoo H, Widhalm JR, Qian YC, Maeda H, Cooper BR, Jannasch AS, Gonda I, Lewinsohn E, Rhodes D, Dudareva N (2013) An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine: phenylpyruvate aminotransferase. *Nat Commun* 4:28-33
- Zamir LO, Tiberio R, Fiske M, Berry A, Jensen RA (1985) Enzymatic and nonenzymatic dehydration reactions of L-arogenate. *Biochemistry* 24:1607-1612
- Zhang XH, Brotherton JE, Widholm JM, Portis AR (2001) Targeting a nuclear anthranilate synthase  $\alpha$ -subunit gene to the tobacco plastid genome results in enhanced tryptophan biosynthesis: return of a gene to its pre-endosymbiotic origin. *Plant Physiol* 127:131-141
- Zhao J, Last RL (1995) Immunological characterization and chloroplast localization of the tryptophan biosynthetic enzymes of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 270:6081-6087