

Identification of Genes Affecting Lycopene Formation in *Escherichia coli* Transformed with Carotenoid Biosynthetic Genes

이영미, 강민정, 윤상환, 옥소원, 김정현, 김선원

경상대학교 식품영양학과

전화(055) 751-5974, FAX (055)751-5971(김선원)

Isoprenoids는 자연계에 존재하는 가장 다양하고 방대한 천연물 군이지만 의외로 기본골격은 IPP(Isopentenyl pyrophosphate)라는 building block의 단순한 중합체인데 Carotenoids, gibberellins, sterols, ubiquinones 등이 대표적인 isoprenoids이다.^{1,2} Isoprenoids의 building block으로 이용되는 IPP는 mevalonate와 nonmevalonate pathway로부터 합성된다^{1,2}.

Lycopene은 carotenoids의 일종으로서 붉은색을 가지며 주로 토마토에 존재하는 천연생리활성물질이다. Lycopene은 carotenoids중에서도 항산화력이 가장 크기 때문에 유해산소로 인한 질병의 예방 및 치료효과가 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 인체는 lycopene 생합성 능력이 없으므로 식물물을 통하여 섭취해야만 한다.³ 그러나 1kg의 토마토로부터 20mg의 lycopene만을 추출할 수 있으므로 생산단가가 높을 것으로 예상된다.

따라서 고부가가치를 지닌 lycopene을 대량 생산하기 위하여 대사공학을 이용해 lycopene 고생산성 대장균을 개발하고자 한다.

대장균은 IPP 생합성 경로로 nonmevalonate pathway를 이용하는데 대장균에는 약 4000개의 유전자가 존재하고 이들 가운데 약 40% 가량은 그 기능이 밝혀져 있지 않고 대장균 유전자의 60%를 차지하는 기능이 밝혀진 유전자들도 외래산물인 lycopene의 대량생산과 생합성 경로에 미치는 영향을 추론하기는 쉽지 않다⁴.

따라서 대장균에서 lycopene 생합성에 관련된 유전자의 발현을 최적화함으로써 대장균의 성장에는 영향을 미치지 않고 lycopene만 과량 합성하도록 설계하고 더불어 재조합 대장균에서 lycopene 합성되는데 있어 주된 bottleneck을 찾아 해결책을 모색하고 있는 중이다. 부가적으로 shot-gun methods를 이용하여 lycopene 합성 대사과정에서 발현량의 증가가 필요한 rate-limiting 유전자들을 탐색하였으나 shot-gun methods를 이용한 non-mevalonate pathway의 unknown gene의 규명은 dxs를 포함하고 있는 H70 clone을 제외한 대부분의 clones가 nonmevalonate pathway와는 관련이 없는 유전자들을 포

함하고 있어서 이 방법을 이용한 nonmevalonate pathway의 unknown part 규명 및 확보는 하지 못했다. Shot-gun 방식은 nonmevalonate pathway의 unknown gene이 rate-limiting step에 관련된 유전자인 경우에만 탐색이 가능하기 때문이다⁵.

그러나 lycopene 생합성에 관련된 다수의 신규유전자들과 기존에 보고된 3개의 유전자(*rpoS*, *yhbL*, *dxs*)가 도출되었으며 특히 lycopene 생산성을 크게 향상시키는 4개의 신규유전자 및 유전자군(*appY*, *phoE*, *dgo* operon, operon of *ycgZ*, *ymgA* and *ymgB*)을 확보할 수 있었다.

클론들의 lycopene 생산성을 보다 정밀하게 정량을 하기 위해서 클론 DNA 내의 insert fragment를 아래 <Fig>에서 보는 바와 같이 pBAD24 vector에 reading frame 방향을 맞춰서 subcloning을 수행하였다. 그 후에 pBAD-L4, pBAD-H36, pBAD-H72, pBAD-H90 플라스미드를 함유한 재조합 *E.coli* DH5α(pAC-LYCO4) 균주들을 배양하여 lycopene 생산성을 분석하였다. 그 결과, 클론 DNA 함유 재조합 대장균의 lycopene 생산성이 대조균주인 pBAD24 vector 함유 재조합 대장균에 비해서 최소 2배 이상 증가한 것을 확인하였다. 특히 pBAD-L4의 경우에는 lycopene 생산성이 3배가 증가하였다. 이 pBAD-L4는 *phoE* 유전자와 *crl* 유전자를 포함하고 있으며 *phoE* 유전자는 phosphate의 uptake를 원활히 하고 *crl* 유전자는 *RpoS*의 활성을 촉진하기 때문에 lycopene 생산성을 증진시켰다. *appY* 유전자를 포함하는 pBAD-H36은 pBAD-L4 다음으로 높은 lycopene 생산성을 보였으나 배양액의 pH가 5.4로 대조균주나 다른 clone들의 배양액 pH인 8.5와 비교해 보았을 때 매우 낮았다. 이런 낮은 pH는 세포의 원활한 대사과정을 저해할 수 있는 수준으로, 배양과정 중의 pBAD-H36의 pH를 보정해 줌으로서 더 높은 lycopene 생산량을 보였다. pBAD-H36의 pH 강하는 *appY* 유전자에 의해 발현되는 *hydrogenase I*의 작용에 의한 것으로 추정된다.

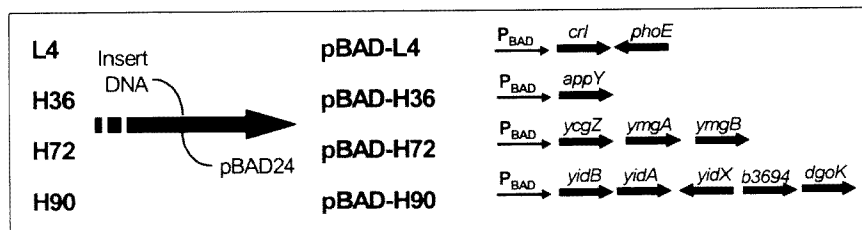


Fig. Subcloning of the insert DNA of shot-gun clones into pBAD24 vector.

Reference

1. P.C.Lee, Schmidt-Dannert , “Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms” (2002), *Appl Microbiol Biotechnol.* , **60**:1-11
2. Seon-Won Kim, J. D. Keasling, “Metabolic Engineering of the Nonmevalonate Isopentenyl Diphosphate Synthesis Pathway in *Escherichia coli* Enhances Lycopene Production.” (2000) , *Biotechnol Bioeng* **72**(4):408-15
3. Sanjiv Agarwal, et. al., “Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases.” (2000) *Canadian Medical Association or its licensors* **163** (6)739-743
4. Felix Rohdich, et. al., “The nonmevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates.” ,(2001)., *Current Opinion in Chemical Biology.*, **5**: 535-540
5. Hisashi Hemmi, et. al., “Identification of Genes Affecting Lycopene Formation in *Escherichia coli* Transformed with Carotenoid Biosynthetic Gene : Candidates for Early Genes in Isoprenoid Biosynthesis.” (1998)*J. Biochem***123**:1088-1096