

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “포스트 극지유전체프로젝트: 극지 유용유전자 발굴을 위한 기능유전체 연구” 과제의 위탁연구 “남극낫깃털이끼 유래 휘발성유기화합물(VOC) 기능 규명 및 관련 유용 유전자원 발굴 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



| | | |
|---------------|---|-------|
| (본과제) 총괄연구책임자 | : | 김진형 |
| 위탁연구기관명 | : | 서울대학교 |
| 위탁연구책임자 | : | 현유봉 |
| 위탁참여연구원 | : | 현유봉 |
| “ | : | 김상규 |
| “ | : | 김동우 |
| “ | : | 방주영 |

요 약 문

I. 제 목

남극낫깃털이끼 유래 휘발성유기화합물(VOC) 기능 규명 및 관련 유용 유전자원 발굴 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

천연생물자원인 남극낫깃털이끼 유래 유용 휘발성유기화합물(VOC) 및 관련 기능유전자원 발굴을 통하여 극지 생명체들의 극지환경 적응기전에 대한 생물학적 이해를 시도하고 이를 토대로 한 극지생물자원 활용방안을 탐색하고자 함

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 휘발성유기화합물(volatile organic compound, VOC)은 끓는 점이 낮아 쉽게 기화하는 액상 또는 기체상의 물질의 총칭
- 식물들은 VOC 분비를 통하여 환경스트레스에 대한 내성 증진, 병저항성, 다른 생물종들과의 상호작용 등을 이루어 내고 있음
- 이러한 식물의 VOC는 해충 저해제, 향수 등과 같은 천연물 유래 유용물질 개발에 활용되며, VOC 생합성 관련 유전자원은 관련 유용물질 대량생산 시스템 구축 등에 적용 가능
- 남극낫깃털이끼는 극지 환경을 우점하는 극지성 선대식물로서, 극지에 서식하는 다양한 생물들과의 상호작용을 통하여 생태계를 이룸
- 본 연구는 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 물질을 목록화하고 동정한 물질 생합성 관련 유전자원을 규명함으로써 극지 식물들이 VOC 생성으로 극지환경에 적응하는 기전을 이해하고 이를 토대로 한 극지생물자원 활용방안을 탐색하고자 함

IV. 연구개발결과

- 남극 현지에서 서식하는 남극낫깃털이끼와 실내재어 멸균배양 조건에서 배양한 남극낫깃털이끼 배양체에서 생성되는 테르펜 계열 VOC 목록을 확보함
- 확보한 VOC 목록에서 개똥쑥에서 최초 추출되어 현재 가장 효과적인 말라리아 치료제로 사용되고 있는 아르테미시닌의 전구물질인 아모르파디엔이 남극낫깃털이끼에서 생성됨을 확인함. 아모르파디엔 생합성은 개똥쑥 외 다른 현화식물들에서 보고된 바 없으나 본 연구를 통하여 최초로 남극 서식 선대식물에서의 아모르파디엔 생합성을 규명함
- 남극낫깃털이끼 유전체에서 terpene synthase 유전자군을 동정하고 in vitro 그리고 ex vivo 분석을 통하여 아모르파디엔 생합성 관련 남극 유래 terpene synthase를 규명함

V. 연구개발결과의 활용계획

- 효소활성의 규명이 이루어진 남극낫깃털이끼 terpene synthase의 경우 유용 천연물질생산 공정 및 작물기능성 증대를 위한 유전자원으로 활용 가능

S U M M A R Y

I. Title

Functional and Genetic Dissection of Volatile Organic Compounds in *Sanionia uncinata*

II. Purpose and Necessity of R&D

The moss *Sanionia uncinata* is a species dominating the maritime Antarctica. This moss species presents an instrumental niche allowing the Antarctic ecosystem to sustain by accommodating Antarctic small animals and vascular plants, assembling microbial communities, and recruiting pathogenic reagents. However, despite the significant ecological positioning of *S. uncinata* in the Antarctic food-web, how the moss species present such unique ecosystem services by intimately interacting with other organisms remains largely unknown.

III. Contents and Extent of R&D

This study investigates the biochemistry and molecular components associated with the production of terpene volatile organic compounds (VOCs) in the Antarctic moss *S. uncinata*.

IV. R&D Results

By profiling the headspace volatiles collected from *S. uncinata* gametophytes inhabiting the Antarctic natural habitat and axenically cultured in the controlled environments, the terpene VOCs emitted by *S. uncinata* have been captured. Notably, the GC-MS analyses revealed that the Antarctic moss produces amorpha-4,11-diene, the precursor of anti-malarian drug artemisinin. Six putative *S. uncinata* terpene synthase (TPS) homologues were characterized, and *in vitro* enzyme activity assay and heterologous expression of the identified TPS homologues revealed one SuTPS enzyme as a sesquiterpene synthase that can facilitate the production of amorpha-4,11-diene if introduced into the model flowering plant *Arabidopsis thaliana*.

V. Application Plans of R&D Results

Our work identifies the inventory of terpene natural compounds that potentially supports *S. uncinata* to exert its ecosystem services in the Antarctic habitat and provides new genetic resource to engineer the synthetic production of artemisinin for pharmaceutical applications.

목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 연구개발목표 달성도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌



본 문

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

천연생물자원인 남극낫깃털이끼(*Sanionia uncinata*) 유래 유용 휘발성유기화합물(VOC) 및 관련 기능유전자원 발굴을 통하여 극지 생명체들의 극지환경 적응기전에 대한 생물학적 이해를 시도하고 이를 토대로 한 극지생물자원 활용방안을 탐색함

제 2 절 연구의 필요성 및 범위, 본과제와의 연계성

1. 연구의 필요성

- 가. 휘발성유기화합물(volatile organic compound, VOC)은 끓는 점이 낮아 쉽게 기화하는 액상 또는 기체상의 물질의 총칭
- 나. 식물들은 VOC의 생성을 통하여 생물학적 그리고 비생물학적 환경 요인에 대한 적응 및 상호작용 등을 이루어 내고 있음
- 다. 이러한 식물의 VOC는 해충 저해제, 향수 등 천연물 유래 유용물질 개발의 자원으로써 활용될 수 있으며, VOC 생합성 관련 유전자원은 관련 유용물질의 대량생산 시스템 구축 등에 적용 가능한 무한한 잠재성을 지님
- 라. 남극낫깃털이끼는 극지 환경을 우점하는 극지성 선대식물로서, 극지에 서식하는 다양한 생물들과의 상호작용을 통하여 극지생태계의 기반을 이루고 있음
- 마. 유전체 및 전사체 등과 같은 대량 생물정보 등이 이미 구축된 남극낫깃털이끼는 VOC 대사체를 통한 극지 식물의 환경적응을 연구하기 위한 효율적인 시스템을 제공
- 바. 본 연구는 남극낫깃털이끼의 VOC 분석을 통하여 극지 식물들이 VOC 생성으로 자신을 둘러싸고 있는 극지 환경 스트레스에 대응하거나, 다른 극지 생물들과 상호작용하는 적응 기작에 대하여 이해하고자 함

사. 나아가 발굴한 VOC 및 관련 유전자원을 활용하여 극지 유래 생물자원의 활용방안을 모색하고자 함

2. 연구의 범위

가. 남극낫깃털이끼의 테르펜 계열 VOC 분석

(1) 식물군에서 가장 큰 천연물집단을 구성하는 테르펜 계열의 VOC 목록을 남극낫깃털이끼에서 규명

(가) 남극낫깃털이끼 VOC 포집 시스템의 확립

(나) 극지 환경 모사 조건 및 남극 현지 서식 남극낫깃털이끼 VOC 대사체 분석

나. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 생합성 경로 기능 유전자군 동정

(1) 남극낫깃털이끼 유전체 및 전사체 내 테르펜 물질 생합성 관련 유전자군 탐색

(2) 남극낫깃털이끼 계절 변동 극지 전사체 활용 테르펜 계열 VOC 포집 조건 발현 생합성 유전자 동정

(3) 탐색한 테르펜 물질 생합성 관련 유전자군의 발현 패턴 분석

다. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 VOC 생합성 관련 유전자 기능성 검증

(1) 남극낫깃털이끼 유래 *TERPENE SYNTHASE* (*SuTPS*) 유전자 cDNA 클론 확보

(2) 동정한 SuTPS 효소의 in vitro 활성 규명

(3) 모델 식물 애기장대에서의 SuTPS 과발현 유도를 위한 재조합 DNA 제작

(4) SuTPS 과발현 애기장대 형질전환체 제작

(5) 제작한 애기장대 형질전환체의 테르펜 계열 VOC 대사체 분석을 통한 SuTPS 기능 검증

3. 본과제와의 연계성

가. 본 연구는 『포스트 극지유전체프로젝트: 극지 유용유전자 발굴을 위한 기능유전체』와 관련하여 선행연구를 통하여 구축된 남극낫깃털이끼의 생명정보를 토대로 함

- 나. 남극낫깃털이끼의 VOC 대사체 및 전사체 분석은 유용 VOC 천연생물자원을 발굴하고 이들의 생합성 경로를 규명하는 스크리닝 과정임
- 다. 이를 통하여 극지 환경에 대응하는 극지 선태식물의 적응전략을 연구하고, 이에 관한 VOC 천연생물자원 및 생합성 관련 기능유전자군을 동정·발굴하고자 함
- 라. 또한 이를 활용한 유용 VOC의 대량 생산시스템의 구축 그리고 해당 VOC 합성 경로의 작물 도입 등과 같은 기술 개발의 생물학적 핵심 기반을 제시하고자 함



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내

1. 산림자원 휘발성유기화합물 분석

- 가. 우리나라는 국토 전체면적의 약 60%가 산림지역으로 식생에서 자연적으로 발생하는 VOC가 많이 배출됨에도 불구하고 관련 연구가 최근에서야 진행 됨
- 나. 국립환경과학원은 생태환경 관측 타워를 설치하고 산림에서 나오는 VOC를 2011년 이후 꾸준히 모니터링 하고 있음 (The study on the emission characteristics of biogenic volatile organic compounds in a forest, 2018)
- 다. 국립산림과학원은 숲에서 나오는 VOC 물질을 수종별로 정성 및 정량 분석 수행 (Jo *et al.*, 2018)
- 라. 그 외 대학이나 연구소를 중심으로 다양한 목본, 초본 식물에서 나오는 VOC 물질의 종류 분석

2. 식물 VOC 물질과 병해충 저항성 연구

- 가. 한국생명공학연구원 류충민 박사 연구팀은 미생물의 VOC 그리고 미생물의 공격을 받은 식물이 발산하는 VOC의 다양한 기능 연구
- 나. 최근 미생물의 영향을 받은 식물의 VOC가 다른 식물의 병저항성 면역을 증가시키는 기작 규명 (Kong *et al.*, 2020)
- 다. 한국과학기술원 김상규 교수 연구팀은 콩에서 나오는 VOC 혼합물이 콩 해충인 톱다리개 미허리노린재를 유인한다는 것을 밝히고 특정 VOC의 유인성을 확인하는 연구 수행 중

3. 식물 VOC 물질 합성 기작과 관련된 유전자 기능 연구는 매우 부족한 상황

제 2 절 국외

1. 식물 VOC 합성 및 기능 연구를 하고 있는 대표적인 연구기관 및 연구내용

- 가. 퍼듀 대학, Natalia Dudareva: 꽃에서 나오는 VOC 물질 동정 및 합성 유전자 동정, 꽃향기 수송체 연구
- 나. 미시간 대학, Eran Pichersky: 식물이 합성하는 VOC 물질 중 특히 향수나 의학적인 목적으로 사용되는 VOC 합성 관련 유전자 동정
- 다. 버지니아텍, Dorothea Tholl: 식물의 VOC를 채집하고 분석할 수 있는 다양한 방법 제시, 식물 뿌리에서 나오는 휘발성 물질의 기능 연구
- 라. 막스플랑크 화학생태학 연구소, Jonathan Gershenzon: 식물에서 합성되는 terpene 계통 VOC 합성 유전자 동정 및 생태적 기능 연구, VOC와 UV 스트레스 저항성 관련 연구 수행
- 마. 막스플랑크 화학생태학 연구소, Ian Baldwin: 식물이 곤충의 공격을 받으면 합성되는 VOC 물질의 합성 기작과 그것의 생태적 기능 연구

2. 극지에 생존하는 미생물 유래 VOC 생리적 기작 및 활용에 관한 연구

- 가. 극지방 미생물 유래 VOC에 의한 밀의 발아 및 성장 촉진 (Yarzabal *et al.*, 2018)

3. 극지지역과 같은 극한 환경에서 서식하는 이끼류 대상 연구 미미한 상황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 대사체 규명

1. 테르펜 계열 VOC 물질

- 가. 테르펜 또는 테르페노이드 계열 물질은 자연계에서 생성되는 천연물의 가장 큰 부분을 차지하는 2차 대사물질임(Connolly and Hill, 1991; Gershenzon and Dudareva, 2007)
- 나. 박테리아와 같은 원핵생물부터 동물, 식물들과 같은 진핵생물까지 모든 생물군에서 테르펜 계열 물질 생성이 확인되어 있음
- 다. 자연계에서 생성되는 테르펜 계열 물질 중 대다수는 식물들에 의해서 생성됨
- 라. 주목, 개똥쭉과 같은 식물이 생성하는 택솔, 아르테미시닌은 항암제, 말라리아 치료제로써 활용되는 대표적 유용 테르펜 계열 천연 물질임
- 마. 생성하는 테르펜 계열 물질 목록이 다수 보고된 고등식물들에 비해 이끼류를 포함하는 basal 육상식물군에서의 테르펜 계열 천연 물질 연구는 매우 부족한 상황

2. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 물질 포집 시스템의 확립

- 가. 남극낫깃털이끼의 극지생태계 지위를 결정하는 생화학적, 분자적 기작을 이해하기 위하여 극한환경에 적응하기 위한 비생물적, 생물적 요인과의 상호작용에서 작동하는 테르펜 계열 VOC 물질을 동정하고 그 기능을 규명함
- 나. 남극 현지 그리고 실내 극지 환경 모사 조건에서 남극낫깃털이끼로부터 분비되는 테르펜 계열 VOC 물질을 포집하기 위한 시스템을 확립함(그림 1)
 - (1) 밀폐용기 내 PDMS 튜브 내부에 도포되어 있는 흡착물질에 테르펜계열 VOC 물질이 포집됨으로써 남극낫깃털이끼로부터 발생하는 휘발성유기화합물 목록 추적 가능
 - (2) 제작한 포집시스템을 활용 무균 배양 조건 그리고 남극현지에서 VOC 포집 시도

테르펜 VOC 포집 시스템



그림 1. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 VOC 물질 포집 시스템. 밀폐용기 내 존재하는 PDMS 튜브 내부에 도포되어 있는 흡착물질에 의하여 테르펜 휘발성유기화합물의 포집이 이루어짐.

3. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 대사물질 목록 규명

가. 극지 유래 유용 천연물질 동정을 위하여 남극낫깃털이끼로부터 포집한 테르펜 계열 VOC 대사물질의 GC-MS 분석 수행(그림 2)



그림 2. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 대사물질의 포집. (A) 실내제어환경조건에서의 남극낫깃털이끼 배양체 테르펜 계열 VOC 포집. (B) 남극 현지 VOC 포집 site 정보. (C) 남극 현지 서식 남극낫깃털이끼 군락에서의 테르펜 계열 VOC 포집.

(1) 무균 실내 배양체: gametophyte, 22oC, 16시간-명조건/8시간-암조건 장일조건

(2) 남극 세종기지 현지 서식 남극낫깃털이끼 gametophyte 군락: 2022년 1-2월(그림 3)

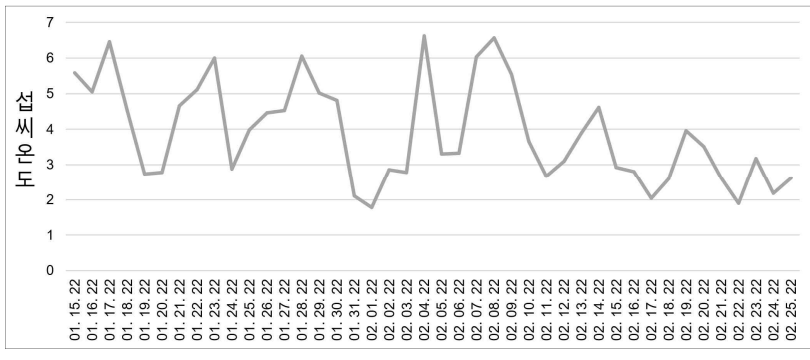


그림 3. 현지 남극 낮깃털이끼 테르펜 계열 VOC 포집 기간 대기 온도 측정 데이터.

(3) 테르펜 VOC 대사체 포집한 PDMS 튜브를 밀폐하여 운반 후 GC-MS 수행(그림 4)



그림 4. 포집한 남극낮깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 대사체 GC-MS 분석.

나. 남극낮깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 목록 확보(그림 1) (표 1)

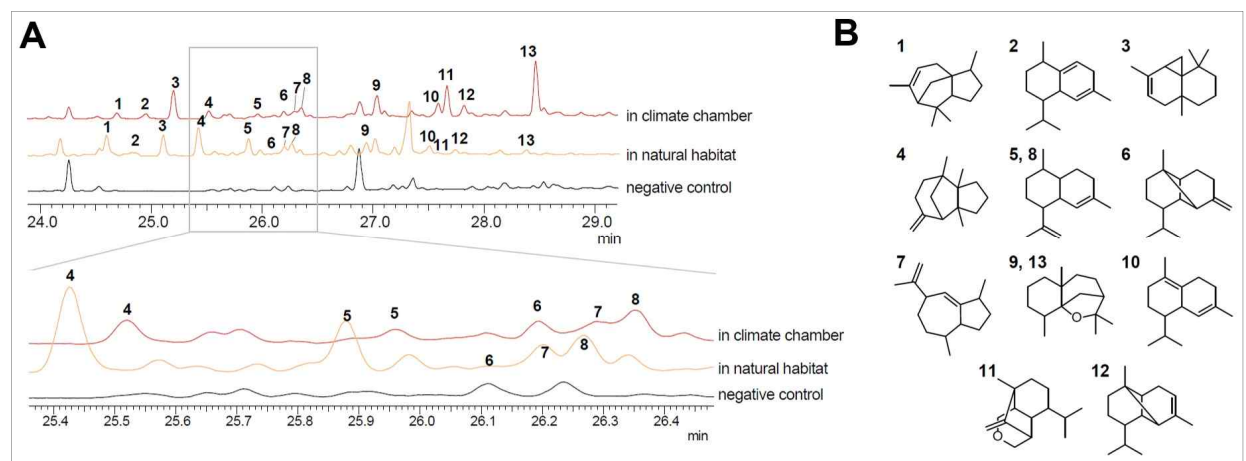


그림 5. 남극낮깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 대사체 GC-MS 분석. (A) GC-MS 분석 결과. (B) GC-MS 분석을 통하여 확인한 남극낮깃털이끼 유래 테르펜 VOC 대사물질 목록.

| No. | RI | Compound Name | Similarity (%) |
|-----|------|--|----------------|
| 1 | 1416 | α -Cedrene | 94 |
| 2 | 1426 | Cadina-1(2),4-diene | 90 |
| 3 | 1436 | cis-Thujopsene | 96 |
| 4 | 1448 | β -Barbatene | 91 |
| 5 | 1465 | Amorpha-4,11-diene | 84 |
| 6 | 1473 | β -Copaene | 88 |
| 7 | 1477 | γ -Gurjunene | 88 |
| 8 | 1480 | Amorpha-4,11-diene | 89 |
| 9 | 1506 | β -Dihydroagarafuran | 91 |
| 10 | 1528 | δ -Cadinene | 85 |
| 11 | 1532 | 9-Isopropyl-1-methyl-2-methylene-5-oxatricyclo[5.4.0.0(3,8)]undecane | 81 |
| 12 | 1538 | α -Copaene | 86 |
| 13 | 1564 | β -Dihydroagarafuran | 90 |

표 1. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 대사물질 목록.

- (1) 포집한 테르펜 VOC 대사체 분석 결과 향균, 제충 효과가 알려진 10여 종의 대사물질의 생성 확인
- (2) 현재까지 구조가 규명되지 않은 극지 유래 신물질 2종 추가 동정
- (3) 현화식물 개똥쑥(*Artemisia annua*)에서만 생성되는 것이 보고되어 있는 말라리아 치료제 아르테미시닌(artemisinin)의 전구체 아모르파디엔(amorpha-4,11-diene)이 남극낫깃털이끼에서 생성됨을 확인함(Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003)
- (4) 현재까지 아모르파디엔은 개똥쑥 외 어떤 식물에서도 생합성이 보고된 바 없으며 극지환경에 적응한 이끼류 남극낫깃털이끼에서 생합성이 확인된 점은 매우 특이할 만한 사항
- (5) 아모르파디엔의 합성은 효모 등과 같은 미생물을 활용한 아르테미시닌 대량 생산 공정에 있어서 생산 효율을 결정하는 주요 생합성 단계이며 이 과정에 관여하는 효소의 동정은 말라리아 치료제 합성 대사공정의 원천 기술 확보의 잠재성 지님(그림 6) (Huang *et al.*, 2021)

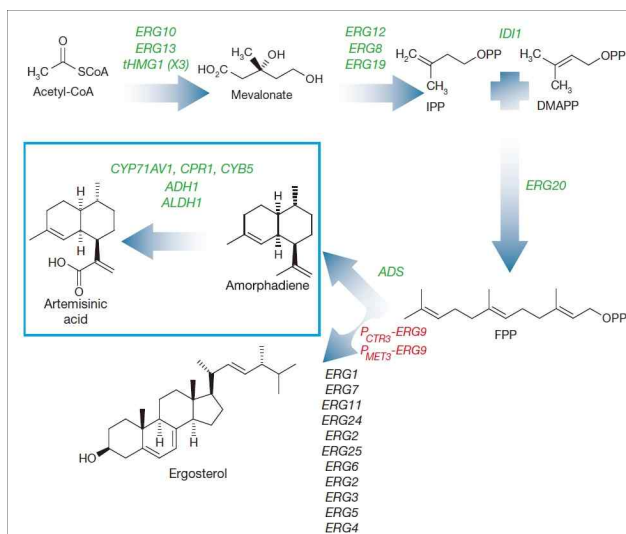


그림 6. 효모에서의 아르테미시닌 합성 경로 (Paddon *et al.*, 2013).

제 2 절 남극낫깃털이끼 테르펜 VOC 생합성 관련 유전자원 탐색

1. 테르펜 생합성 유전자 terpene synthase (TPS)

가. 자연계에서 생성되는 테르펜 계열 물질의 생합성은 terpene synthase (TPS) 효소에 의해 개시됨

나. TPS 효소들은 각 효소들이 특이적으로 활용하는 기질의 뼈대를 이루는 탄소 개수에 따라 monoterpene synthase (C10), sesquiterpene synthase (C15), diterpene synthase (C20)로 분류됨(그림 7)

(1) 개똥쑥에서 아르테미시닌 합성은 탄소분자를 15개 갖고 있는 기질인 farnesyl pyrophosphate로부터 amorpho-4,11-diene을 합성하는 sesquiterpene synthase amorpho-4,11-diene synthase (ADS) 효소에 의해서 개시됨(Fang et al., 2017)

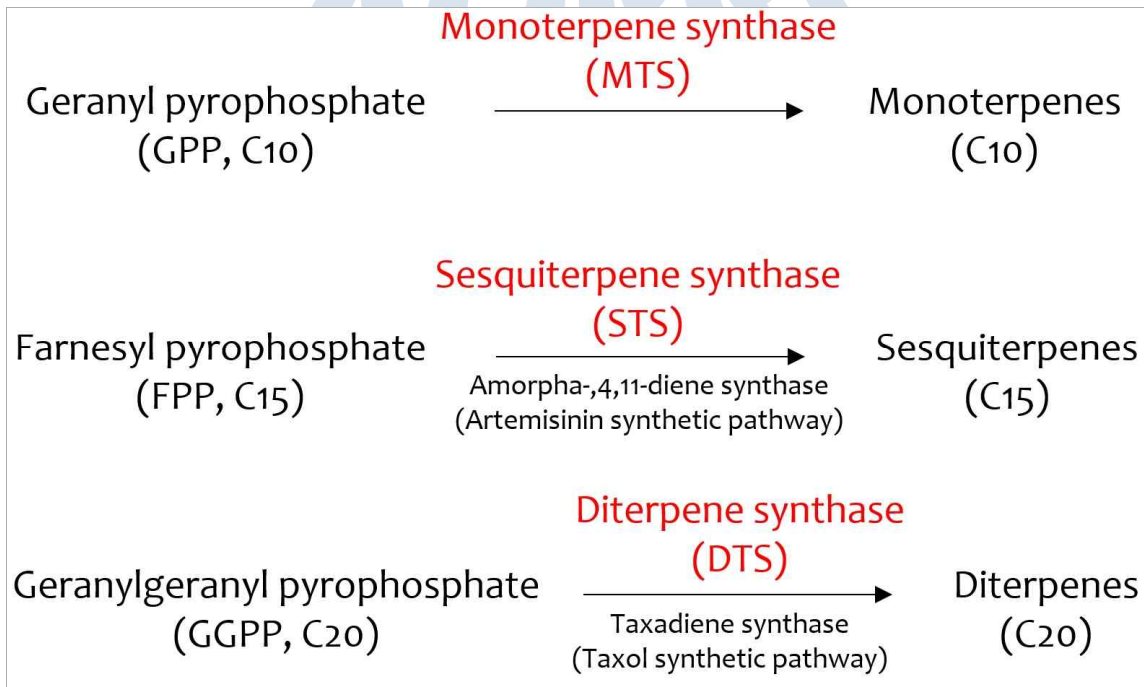


그림 7. 기질 특이성을 토대로 한 terpene synthase의 분류.

다. 식물군에 존재하는 TPS 효소들은 또한 모든 육상식물들에서 확인이 되는 typical plant TPS와 이끼류 등을 포함하는 non-seed plant에서만 존재하는 microbial TPS-like (MTPSL)로 진화적 기원을 토대로 분류하기도 함(그림 8)

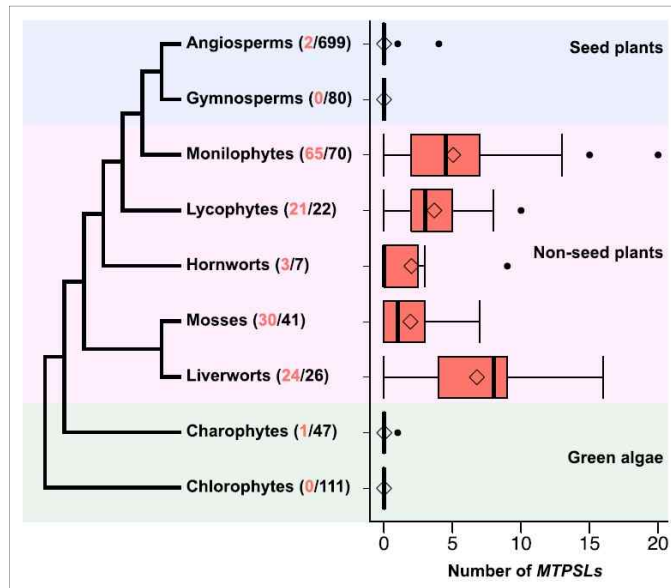


그림 8. MTPSL의 식물군 내 분포 (Jia *et al.*, 2016). 육상 non-seed plant에서만 주로 관측됨. 괄호 내 숫자: 해당 식물 분류군에서 관측된 MTPSL 후보 유전자/총 TPS 유전자 수

2. 남극낫깃털이끼 유래 TPS 효소의 동정

가. 대사체 분석을 통하여 확보한 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 물질의 생합성 경로를 규명하기 위하여 테르펜 생합성을 개시하는 TPS 효소들의 동정을 시도함(그림 9)

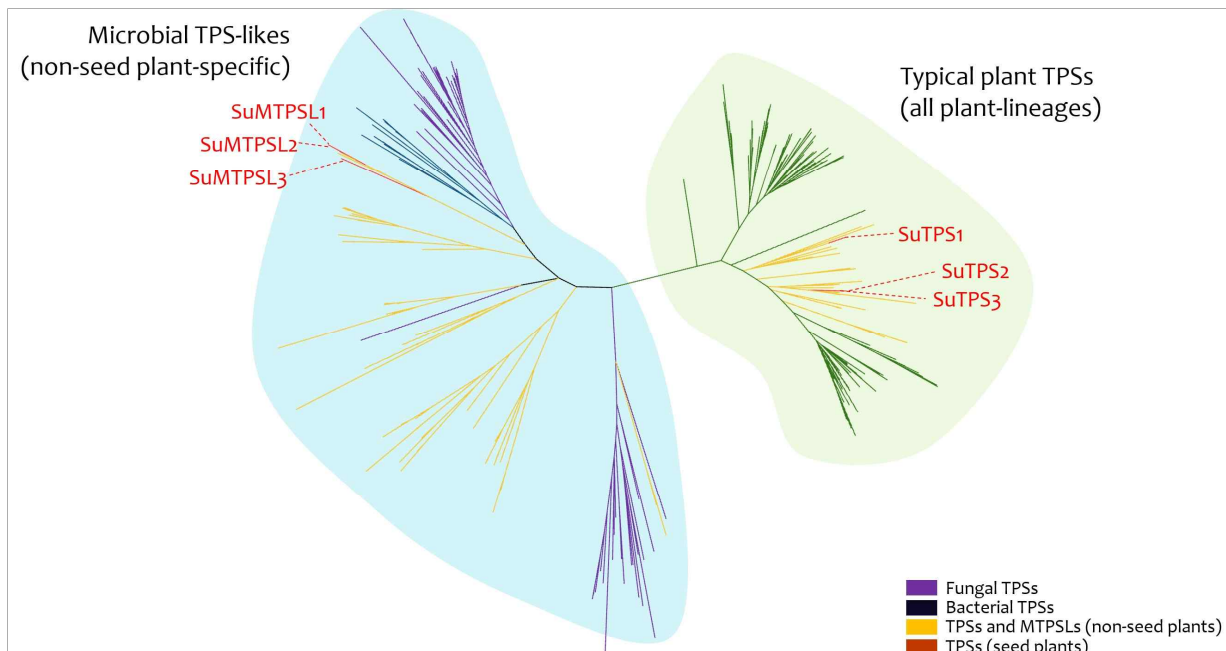


그림 9. 남극낫깃털이끼 유전체 분석을 통하여 탐색된 terpene synthase들의 진화적 유연관계 분석.

나. 주관연구기관의 선행연구를 통하여 기 확보한 남극낫깃털이끼 유전체 대량생물정보를 활용 남극낫깃털이끼 *TPS* 상동유전자(homologous gene)의 탐색을 시도

(1) 다른 생물들의 *TPS* 효소들에서 보존되어 있는 것으로 확인된 *TPS catalytic domain*의 아미노산 서열과 유사 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자들을 검출함

(2) 총 6개의 *TPS* 후보 유전자의 선별 완료

다. 현재까지 아미노산 서열이 보고된 *TPS* 효소들과의 유연관계 분석을 수행하여 남극낫깃털이끼에서 확인한 *Sanionia uncinata TPS (SuTPS)* 유전자들의 진화적 기원에 따른 분류 시도

(1) 검출된 6종의 *SuTPS* 효소 중 3개의 효소는 typical plant *TPS*로 분류됨

(가) 남극낫깃털이끼 typical plant *TPS*는 *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuTPS3*로 명명

(2) 나머지 3종의 *TPS* 효소는 미생물들의 *TPS* 효소와 진화적 기원을 공유하는 microbial *TPS-like*로 분류됨

(가) 남극낫깃털이끼 microbial *TPS-like*는 *SuMTPSL1*, *SuMTPSL2*, *SuMTPSL3*로 명명

3. 남극낫깃털이끼 유래 *TPS* 효소 클론 제작

가. 남극낫깃털이끼 유전체에서 검출된 *SuTPS* 및 *SuMTPSL* 효소들의 기능검증을 위하여 해당 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 패턴 및 full-length cDNA 클론 확보 진행

나. 남극 현지 이끼 시료에서 확보한 계절 변동 전사체 분석을 통하여 테르펜 계열 VOC 대사체 포집을 진행하였던 극지 여름동안 발현양이 높은 유전자의 동정 완료(그림 10)

(1) *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2*

(2) 나머지 *TPS* 유전자의 경우 발현양이 모든 계절에 걸쳐 전반적으로 낮거나 겨울동안 주로 발현하는 것으로 확인

(3) 계절 변동 전사체 분석을 통하여 남극 현지에서 포집된 테르펜 계열 VOC 대사물질의 합성에 *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2*가 관여할 것을 제안함

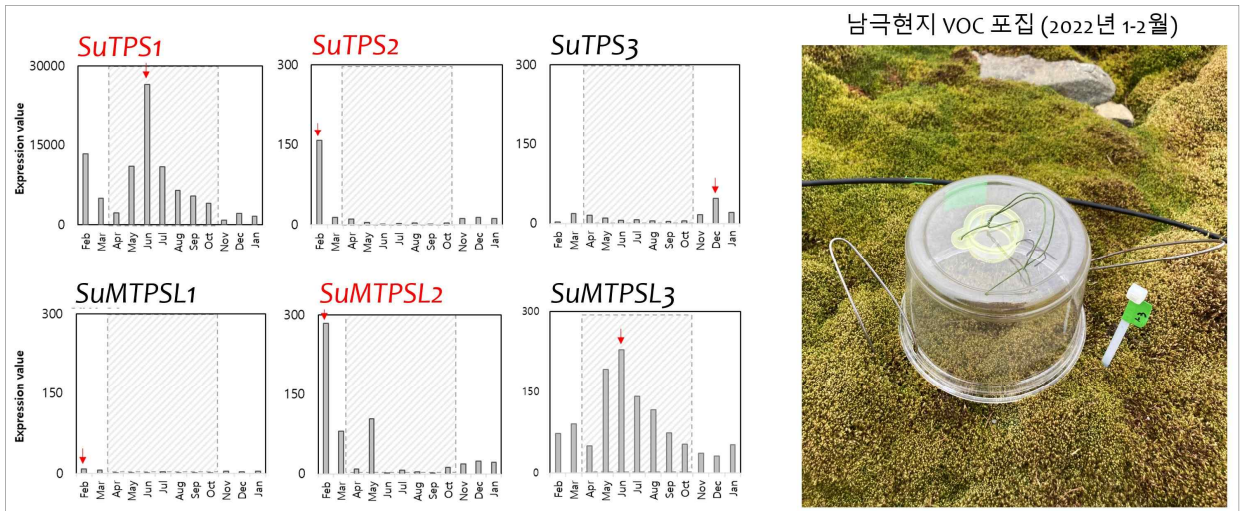


그림 10. 탐색된 남극남짓털이끼 terpene synthase의 남극 현지 계절 변동 발현 패턴. *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2* 유전자에서 테르펜 계열 VOC 대사물질 포집을 진행하였던 1-2월 경 높은 발현을 확인함.

다. 실내 제어 환경 테르펜 VOC 대사체 분석과 동일 조건에서 배양한 남극남짓털이끼 gametophyte에서의 *TPS* 유전자 발현 분석 및 full-length cDNA 클론 제작(그림 11)

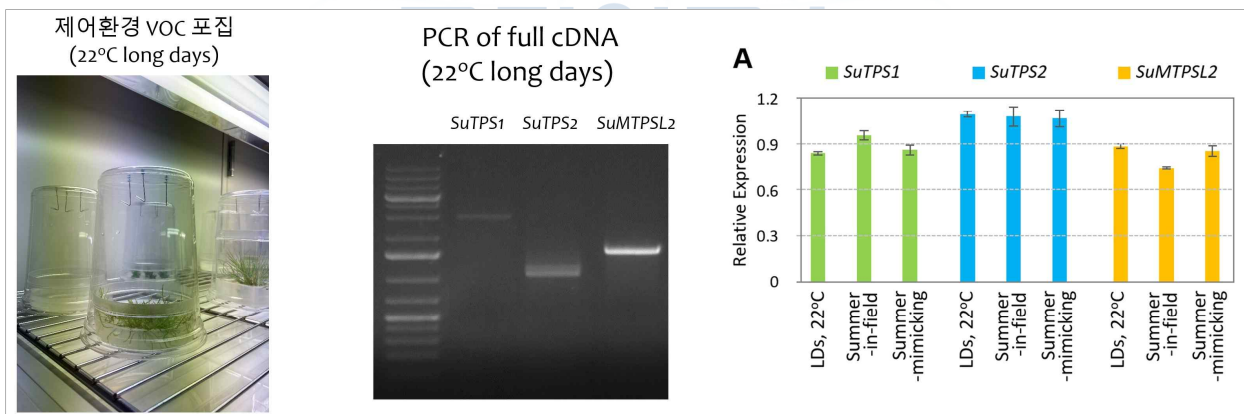


그림 11. 남극남짓털이끼 terpene synthase homologous gene의 full-length cDNA 클로닝 및 발현 분석.

- (1) Total RNA 추출 후 남극남짓털이끼 유전체에서 탐색된 6종의 *TPS* 후보 유전자들의 full-length cDNA 클론 확보 시도
- (2) 계절 변동 전사체에서 발현이 확인된 *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2*의 full-length cDNA 의 PCR 증폭 및 클로닝 완료함

- (3) 나머지 남극낫깃털이끼의 *TPS* 유전자의 경우 full-length cDNA PCR 증폭되지 않음
- (4) 남극 현지 여름 조건을 모사하는 실내 배양 조건에서는 해당 유전자들의 발현양이 낮거나 특정 환경 조건 또는 특정 조직에서만 발현할 것으로 추정
- (5) Full-length cDNA가 확보된 *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2*의 경우 남극 현지 여름, 일반 실내 배양 조건, 여름 조건을 모사한 실내 배양 조건 모두에서 비슷한 정도로 발현이 이루어짐을 reverse transcription-coupled quantitative PCR (RT-qPCR) 분석을 통하여 확인함
- (6) 대사체 분석을 통하여 검출한 남극낫깃털이끼 테르펜 계열 VOC 대사물질 생합성과 *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2* 효소의 관련성을 지지하는 추가 결과

4. *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2* 단백질 심층 분석

가. Full-length cDNA 클론 확보 및 발현 패턴 분석을 통하여 극지 유래 테르펜 계열 VOC 물질 생합성과의 관련성이 제안된 *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2* 효소의 protein functional domain structure 심층 규명 진행(그림 12)

나. 자연계에 존재하는 TPS 효소들의 구조 비교를 통하여 TPS 효소들은 α , β , γ domain으로 명명된 3종의 domain들이 module화 하여 구성된 것으로 밝혀져 왔음(Gao *et al.*, 2012)

- (1) Typical plant diterpene synthase들은 α , β , γ domain을 모두 포함하는 구조로 이루어져 있으며 typical plant TPS로 분류되었던 *SuTPS1*의 구조가 이와 동일한 형태로 이루어져 있음을 확인(Koksal *et al.*, 2011; Starks *et al.*, 1997)
- (2) Typical plant monoterpene 또는 sesquiterpene synthase는 β , γ domain으로만 이루어져 있으며 *SuTPS2*의 구조와 유사성을 확인함(Lesburg *et al.*, 1997)
- (3) Microbial terpene synthase-like 효소들은 반면 대체로 γ domain 하나의 구조만 갖는 것으로 보고되었으며 *SuMTPSL2*의 단백질 구조에서 위의 구조적 유사성을 확인함(Rynkiewicz *et al.*, 2001)
- (4) 위의 protein functional domain 구조 분석 결과는 해당 효소들의 유연관계 분석을 통하여 확인한 진화적 기원 결과와 일치함

다. TPS 효소들은 생화학적 작동 기작에 따라 ionization-induced carbocation 반응을 활용하는 class I 그리고 protonation-induced carbocation 반응을 활용하는 class II 그리고 두 가지 반응 기작을 모두 활용하는 bifunctional class로 구분하기도 함

- (1) Class I TPS 효소들은 aspartate-rich DDxxD motif를 α domain에 class II TPS 효소들은 DxDD motif를 β domain에 갖고 있는 것으로 보고
- (2) SuTPS1은 bifunctional TPS 반면 SuTPS2, SuMTPSL2는 class I TPS 효소로 분류함

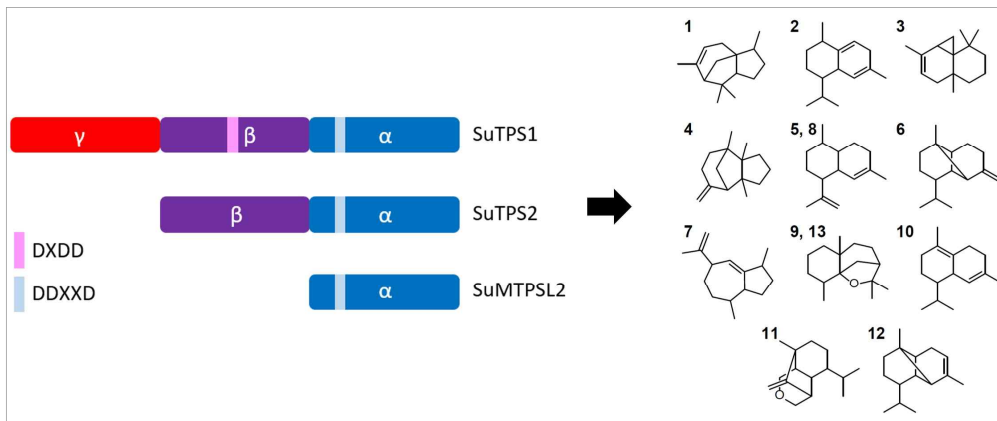


그림 12. SuTPS1, SuTPS2, SuMTPSL2 terpene synthase의 protein functional structure 분석.

극지연구소

제 3 절 남극낫깃털이끼 TPS 효소 기능 규명

1. 남극낫깃털이끼 TPS 유전자 과발현 형질전환 재조합 DNA 제작

- 가. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 생합성 관련 후보 유전자원으로 탐색한 SuTPS1, SuTPS2, SuMTPSL2의 효소 활성 및 생물학적 기능검증 진행
- 나. 비모델 식물인 남극낫깃털이끼의 경우 형질전환기법이 확립되어 있지 않아 위에서 탐색한 효소들의 *in vivo* 기능성 검증에 기술적 한계 존재함
- 다. 이러한 기술적 제약을 우회하여 남극낫깃털이끼 TPS 효소들의 생화학적, 생물학적 활성을 *ex vivo*, *in vitro* 분석을 통하여 규명 시도
- 라. SuTPS1, SuTPS2, SuMTPSL2의 full-length cDNA를 식물형질전환 벡터 myc-pBA(Choi *et al.*, 2011)에 존재하는 CaMV 35S promoter 하위에 삽입하여 식물체에서 위 TPS 효소들의 과발현을 유도함(그림 13)

(1) CaMV 35S promoter: 하위 유전자의 식물체 과발현 유도

(2) myc-tag: TPS 단백질의 발현 여부를 확인 위함

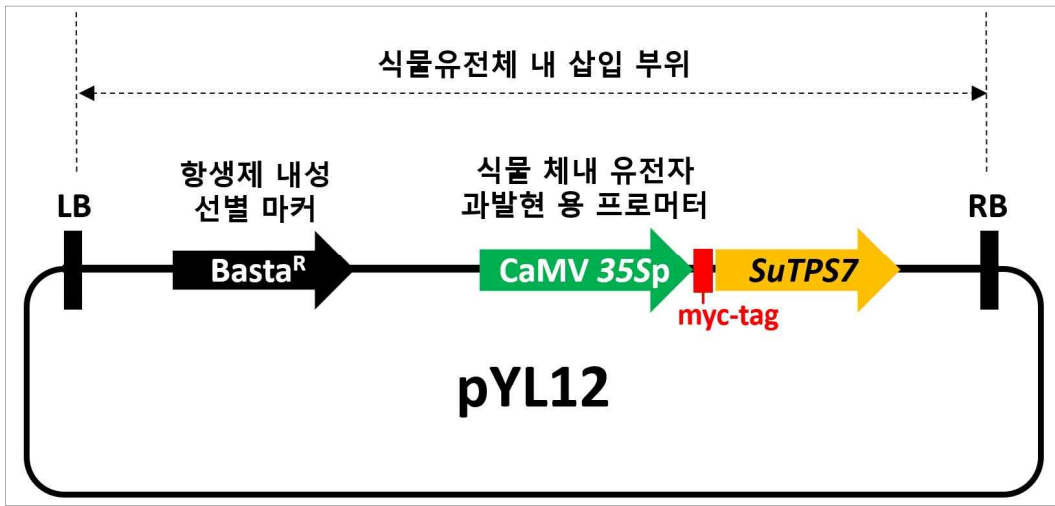


그림 14. *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2* 과발현 애기장대 형질전환 식물체 제작을 위한 재조합 construct.

2. 남극낫깃털이끼 *TPS* 유전자 과발현 애기장대 형질전환 식물체의 제작

가. 제작된 *35S::myc-SuTPS1*, *35S::myc-SuTPS2*, *35S::myc-SuMTPSL2* construct들을 *agrobacterium*-mediated 형질전환기법 통하여 애기장대에 도입(Clough and Bent, 1998)

나. 형질전환체 선별을 통하여 확립한 T1 개체들의 잎에서 RNA를 추출하여 도입한 형질전환 유전자로부터 남극낫깃털이끼 유래 *TPS* 효소 유전자들의 과발현을 RT-qPCR을 통하여 확인함(그림 15)

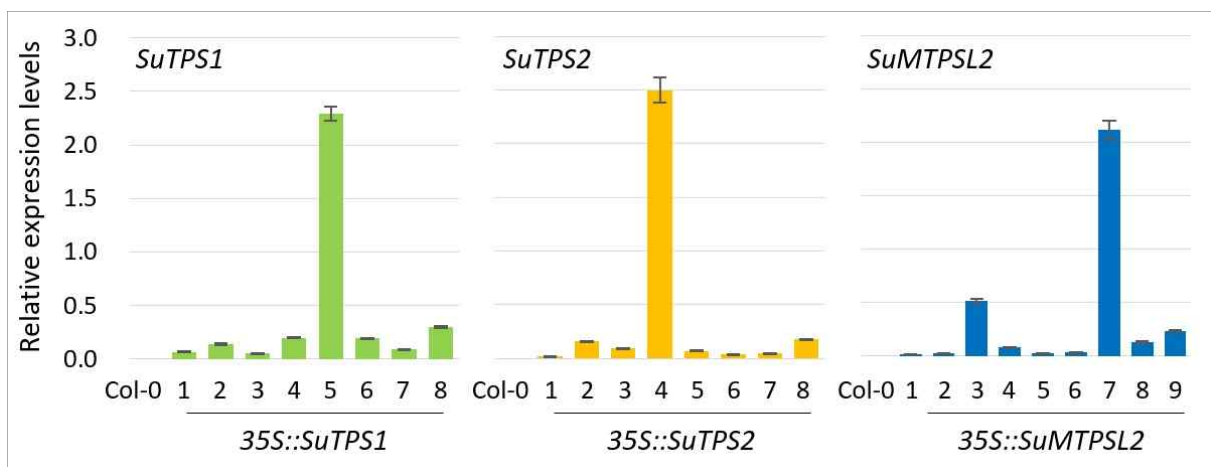


그림 14. 확립한 애기장대 형질전환체에서 확인한 *SuTPS1*, *SuTPS2*, *SuMTPSL2*의 과발현.

다. 확립된 형질전환 애기장대 T1 개체들은 성장 및 발달에 야생형과 큰 차이를 보이지 않음

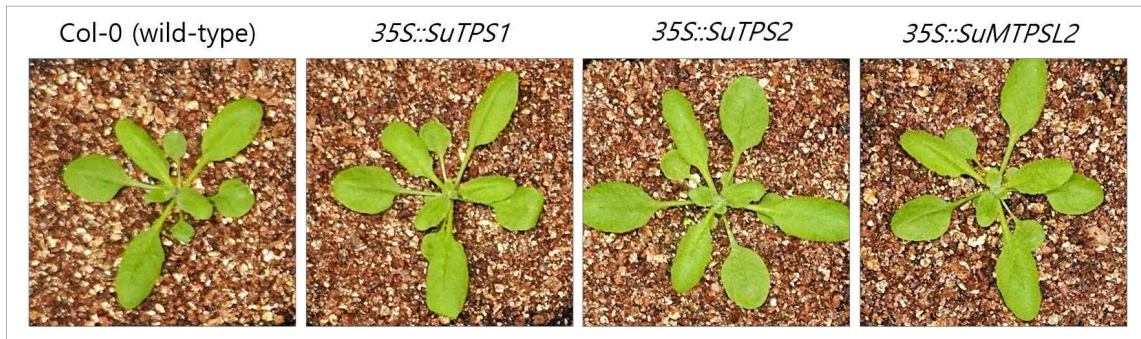


그림 15. 남극낫깃털이끼 terpene synthase 과발현 애기장대 형질전환체의 성장·발달 패턴.

3. 남극낫깃털이끼 TPS 유전자 과발현 애기장대 형질전환 식물체의 제작

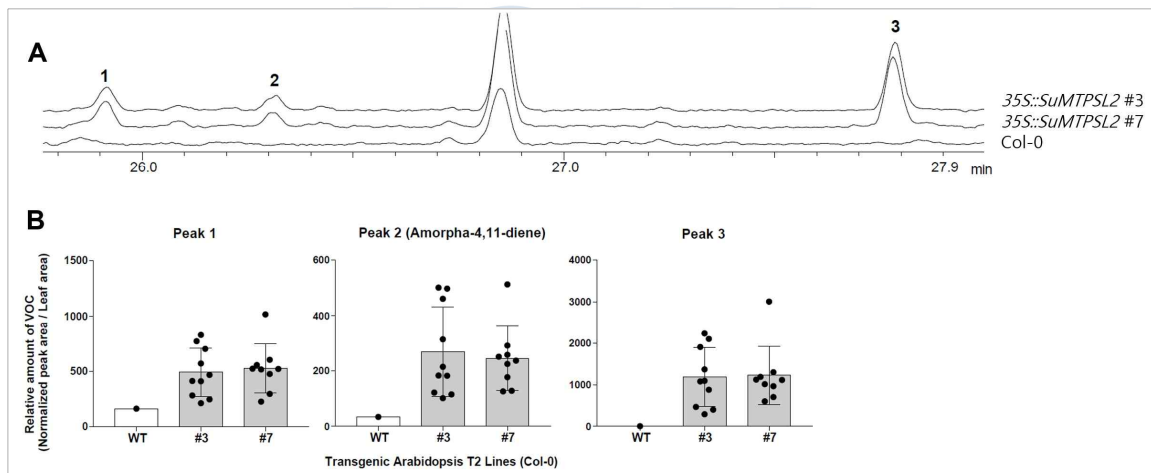


그림 16. *35S::SuMTPSL2* 애기장대 형질전환 식물체에서의 테르펜 계열 VOC 물질 분석 및 아모르파디엔의 합성 유도. (A) 야생형, 형질전환 애기장대의 테르펜 계열 VOC 대사체 GC-MS 분석. (B) *35S::SuMTPSL2* 형질전환 애기장대 식물체에서의 아모르파디엔 합성 유도.

가. 애기장대로 도입한 남극낫깃털이끼 유래 TPS 효소들의 기능성 검증을 위하여 *35S::myc-SuTPS1*, *35S::myc-SuTPS2*, *35S::myc-SuMTPSL2* 과발현 애기장대 T1 형질전환체들의 앞에서 발생하는 테르펜 계열 VOC 대사물질을 포집하여 야생형 애기장대의 대사체와 비교 분석 수행(그림 17)

나. 해당 분석 결과 SuMTPSL2가 과발현한 *35S::SuMTPSL2* 애기장대 형질전환식물체에서 남극낫깃털이끼에서 확인된 아모르파디엔의 생성이 유도되었음을 확인

다. 위의 결과는 남극낫깃털이끼의 terpene synthase SuMTPSL2이 극지 유래 유용 천연물질인 아모르파디엔의 합성에 관여하고 있음을 나타내는 직접적 증거

라. 아모르파디엔은 현화식물 개똥쑥의 ADS 효소를 통한 합성만이 보고되었으나 본 연구를 통하여 극지 환경에 적응한 이끼류 식물의 TPS 효소 중 microbial TPS-like 중 하나가 동일한 생합성 과정을 매개할 수 있음을 최초 규명

마. 향후 SuMTPSL2의 활용방안에 대한 추가적 연구의 필요성을 제기함

4. 남극낫깃털이끼 SuMTPSL2의 생화학적 활성 심층 규명

가. 말라리아 치료제 아르테미시닌 전구체 아모르파디엔의 합성은 sesquiterpene synthase ADS에 의해 매개

나. 남극낫깃털이끼 SuMTPSL2의 과발현을 통하여 애기장대에서 확인한 아모르파디엔 생합성 유도는 SuMTPSL2가 sesquiterpene synthase로서 작동할 것임을 제안함

다. 이러한 제안은 위의 protein functional domain 분석 및 TPS 효소 간 진화적 유연관계 분석에서도 제안된 내용과 일치함

라. 이를 검증하기 위하여 개똥쑥의 ADS 효소와 SuMTPSL2 효소를 *E. coli*에서 각각 발현 후 정제하여 *in vitro*에서의 활성 분석 진행(그림 18)

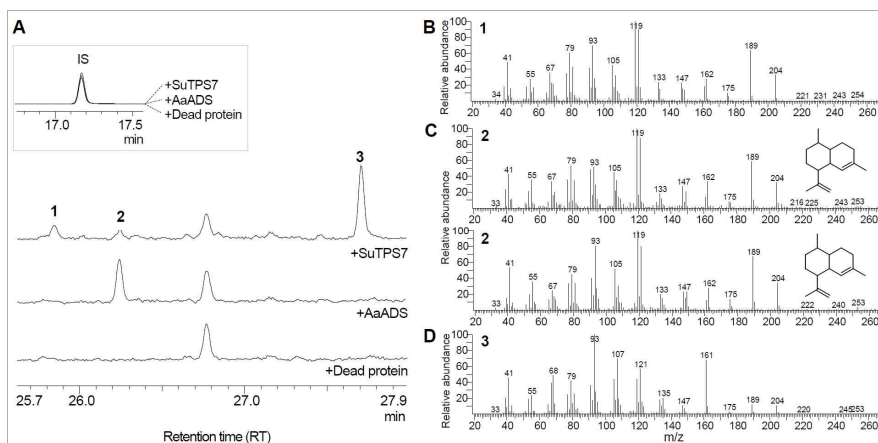


그림 17. ADS, SuMTPSL2의 *in vitro* 활성 비교 분석. (A) Peak 1: Amorphadiene-like unknown. Peak 2: Amorpha-4,11-diene. Peak 3: Germacrene B. (B-D) ADS, SuMTPSL2에 의해 생성된 산물의 mass spectra.

마. *In vitro* 분석을 통하여 SuMTPSL2이 sesquiterpene synthase들과 유사하게 farnesyl pyrophosphate을 기질로 사용하여 terpene을 생성함을 확인

바. 위의 결과들은 애기장대 과발현을 통하여 확인된 SuMTPSL2의 생물학적 기능과도 잘 부합함

사. SuMTPSL2의 경우 farnesyl pyrophosphate로부터 아모르파디엔을 특이적으로 합성하는 ADS와 달리 amorphadiene-like unknown, Germacrene B를 동시에 합성하는 물질 생성 경로의 promiscuity를 나타냄을 확인함

아. *In vitro* 실험을 통하여 확인한 SuMTPSL2의 효소 활성의 확인을 위하여 ADS, SuMTPS2를 담배(*Nicotiana benthamiana*)의 잎에서 transient하게 발현시킨 한 후 두 효소의 과발현 후 생성이 유도되는 테르펜 계열 VOC 대사물질의 비교를 추가로 수행함(그림19)

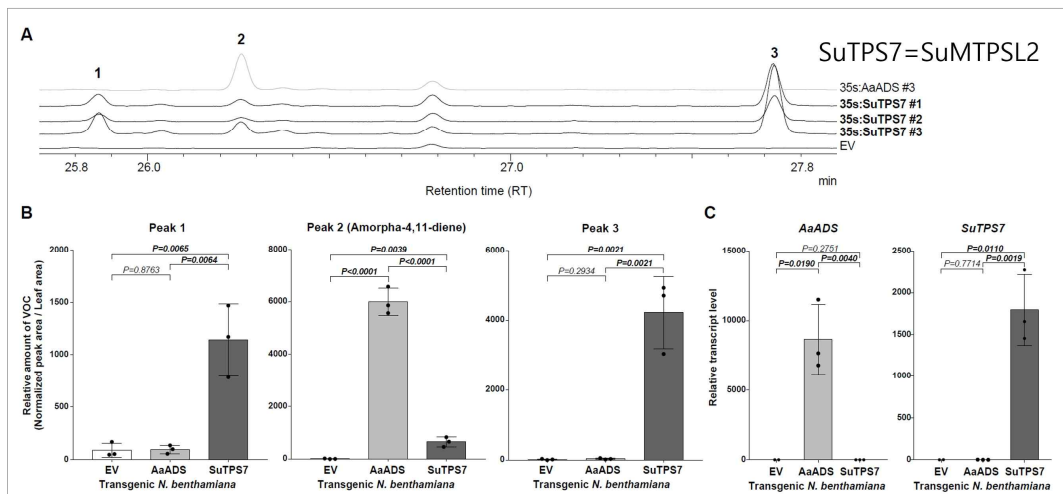


그림 18. *N. benthamiana* transient expression 실험을 통한 ADS, SuMTPSL2 효소의 테르펜 생합성 활성 비교. (A) ADS, SuMTPSL2 transient expression 후 유도된 테르펜 VOC 물질 GC-MS 분석. (B) 생성 산물의 정량 비교. (C) ADS, SuMTPSL2의 과발현 확인.

자. 담배 transient expression 실험에서 다시 한번 SuMTPSL2 도입에 의한 아모르파디엔 합성 유도 현상이 관측됨

차. 그러나 in vitro 활성 분석에서 확인한 것과 같이 SuMTPS2의 도입은 아모르파디엔 합성을 특이적으로 유도하는 ADS에 비교하여 추가적인 sesquiterpene을 합성 유도함을 확인함

카. 향후 SuMTPSL2의 활용방안에 대한 추가적 연구의 필요성을 제기

제 4 장 연구개발목표 달성도

제 1 절 연도별 연구개발목표 달성도

1. 2021년(1년차)

가. 연구개발목표 수행

(기준일: 2023. 01. 31.)

| 세부연구목표 | 수행내용 | 연구 기간 | | | | | | | | | | | | 진도율 (%) |
|------------------------------------|-------------------------------|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|---------|
| | | 2021년 | | | | | | | | | | | | |
| | | 1월 | 2월 | 3월 | 4월 | 5월 | 6월 | 7월 | 8월 | 9월 | 10월 | 11월 | 12월 | |
| 남극낫깃털이끼 휘발성유기화합물(VOC) 분석 | VOC 포집 실내 배양 시스템 구축 | | | | | | | | | | | | | 100% |
| | 남극낫깃털이끼 VOC 대사체 판독 | | | | | | | | | | | | | 100% |
| 남극낫깃털이끼, 서리아끼 VOC 합성 관련 유전자군 비교 탐색 | 남극낫깃털이끼 전사체 규명 | | | | | | | | | | | | | 100% |
| | 극지유래 VOC 생합성 관련 기능 유전자 후보군 선별 | | | | | | | | | | | | | 100% |

□ 당초계획 ■ 실적

나. 연구개발 목표별 달성도


| 성과목표 | 세부목표 | 달성 주요내용 | 달성도(%) |
|-------------------|---------------------------------|--|--------|
| 1. 남극낫깃털이끼 VOC 규명 | 1-1 남극낫깃털이끼 단일 배양 VOC 포집 시스템 구축 | - 남극낫깃털이끼 VOC 포집을 위한 단일 배양 시스템 구축 완료 | 100% |
| | 1-2 남극낫깃털이끼 VOC 판독 | - 극지 환경 조건에서 생성되는 남극낫깃털이끼 유래 테르페노이드(terpenoid) VOC 목록 확보 - 남극낫깃털이끼에 추가하여 극지 지의류, 현화식물이 분비하는 테르페노이드 VOC 목록 추가 확보 | 100% |

| | | | | |
|------------------------------|-----|--|--|------|
| | 1-3 | 극지유래 VOC 기능 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 남극낫깃털이끼 유래 균류 및 세균 억제 기능 테르페노이드 VOC 후보 물질 선별 (3종) - 지구온난화에 의한 극지방 기온 상승에 따른 식물-미생물 상호작용에 관한 연구의 확장성 제시 | 100% |
| 2. 남극낫깃털이끼 VOC 생합성 관련 전사체 규명 | 2-1 | 남극낫깃털이끼, 서리이끼 (비극지성) VOC 생합성 관련 전사체 판독 | <ul style="list-style-type: none"> - 남극낫깃털이끼 테르페노이드 VOC 생합성 관련 유전자 계절 변동, 실내 모사 조건 발현 패턴 규명 - 남극낫깃털이끼 극지 계절 모사 조건 RNA-seq 전사체 정보 확보 - 비극지성 서리이끼 환경반응 전사체 판독 관련 연구목표 수정 필요 | 70% |
| | 2-2 | 극지 고유 VOC 생합성 경로 관련 유전자원 분류 | <ul style="list-style-type: none"> - 남극낫깃털이끼 유전체 심층 분석을 통한 테르페노이드 생합성 TPS 유전자 동정 - <i>SuTPS1</i> ~ <i>SuTPS3</i>, <i>SuMTPSL1</i> ~ <i>SuMTPSL3</i> 6종의 후보유전자 발현 패턴 분석 및 기능성 검증 위한 클론 확보 | 100% |

다. 연구수행 세부 내용 및 결과

(1) 성과목표 1: 남극낫깃털이끼 유래 유용 VOC 대사물질 규명

(가) 세부목표 1-1: 남극낫깃털이끼 테르펜 계열 VOC 대사물질 판독

| 연구 내용 | 연구 결과 |
|------------------------------|---|
| 남극낫깃털이끼 VOC 포집용 단일 배양 시스템 구축 | <p>극지 환경(광조건 등) 모사 실내 제어 이끼 배양 및 VOC 포집 시스템 구축</p>  |
| 남극낫깃털이끼 유래 VOC 대사체 GC-MS 분석 | <p>구축한 배양 조건에서 발생하는 남극낫깃털이끼 유래 테르페노이드 VOC 목록 확보. <i>S. uncinata</i> 에서 테르펜 (terpenes), 특히 세스퀴테르펜 (sesquiterpene) 물질이 주로 발향 함을 확인</p> |

| | |
|-------------------------------------|--|
| | |
| <p>극지 식물 유래 VOC 대사체 GC-MS 추가 분석</p> | <p>구축한 배양조건에서 발생하는 남극개미자리(이끼), 남극 쯔새풀(현화식물) 유래 테르페노이드 VOC 목록 추가 확보</p> |

(나) 세부목표 1-2: 남극낫깃털이끼 테르펜 계열 VOC 대사물질 판독

| 연구 내용 | 연구 결과 |
|---------------------------|---|
| 남극낫깃털이끼 유래 기능성 VOC 후보군 탐색 | 3종의 anti-fungi, anti-bacteria 기능성 테르페노이드 VOC 검출 cis-Thujopsene, alpha-Cedrene, alpha-Copaene |

(2) 성과목표 2: 남극낫깃털이끼 테르펜 계열 VOC 물질 생합성 관련 전사체 규명

(가) 세부목표 2-1: 남극낫깃털이끼 테르펜 계열 VOC 물질 생합성 관련 전사체 판독

| 연구 내용 | 연구 결과 |
|---|--|
| 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 <i>SuTPS</i> 유전자군의 계절 변동 발현 분석 | <p>극지 서식지에서 확보한 남극낫깃털이끼 전사체 분석을 통한 <i>SuTPS</i> 유전자들의 계절 변동 발현 패턴 규명</p> |
| 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 <i>SuTPS</i> 유전자군의 극지 환경 모사 실내 제어 조건 발현 분석 | 극지 환경 모사 조건에서 확보한 남극낫깃털이끼 유전자 발현 분석(RNA-seq, RT-qPCR)을 통한 <i>SuTPS</i> 유전자들의 발현 패턴 상관관계 확인 |

(나) 세부목표 2-2: 극지 유래 테르펜 계열 VOC 물질 생합성 경로 유전자원 분류

| 연구 내용 | 연구 결과 |
|--|--|
| <p>남극낫깃털이끼 유전체 심층 분석을 통한 테르페노이드 생합성 TPS 유전자 동정</p> | <p>총 8종의 <i>SuTPS</i> 유전자 동정, <i>TPS</i> 유전자 유연관계 분석을 통하여 plant type과 non-plant type <i>SuTPS</i>로 진화적 기원 분류 규명</p> <p>Eight <i>SuTPS</i> candidates were predicted from Su ver3.2 Genome DB</p> |
| <p><i>SuTPS</i> 유전자 기능 검정 준비</p> | <p>동정한 <i>SuTPS</i> 유전자 cDNA 합성 및 클론 확보 완료</p> |

라. 평가의 착안점

| 년도 | 성과목표 | 세부목표 | 가중치 (%) | 평가의 착안점 및 척도 |
|------------|---------------------------|---------------------------------------|---------|--|
| 1차년도(2021) | 남극낫깃털이끼 VOC 규명 | 남극낫깃털이끼 VOC 30 | 30 | 남극낫깃털이끼 VOC 목록 구축 유무 |
| | | 극지 유래 VOC 기능 연구 | 20 | 2종 이상 기능성 VOC 후보 선별 및 관련 연구 진행 |
| | 남극낫깃털이끼 VOC 생합성 관련 전사체 규명 | 남극낫깃털이끼, 서리이끼(비극지성) VOC 생합성 관련 전사체 규명 | 20 | 정상조건 및 스트레스조건(UV 광해, 저온 등) 전사체 (종별) 확보 유무 |
| | | 극지 고유 VOC 생합성 경로 관련 유전자원 분류 | 30 | 극지 유래 VOC 생합성 관련 유전자 후보 2종 이상 선별 및 모델식물에서 발현 후 VOC 변화 측정 |

2. 2022년(2년차)

가. 연구개발목표 수행

(기준일: 2021. 07. 06.)

| 세부연구목표 | 수행내용 | 연구기간 | | | | | | | | | | | | 진도율 (%) |
|----------------------------|--|------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|---------|
| | | 20년 | | | | | | | | | | | | |
| | | 1월 | 2월 | 3월 | 4월 | 5월 | 6월 | 7월 | 8월 | 9월 | 10월 | 11월 | 12월 | |
| 남극낫깃털이끼 VOC 규명 | 남극낫깃털이끼 무균배양체의 테르페노이드 VOC 목록 확보 | | | | | | | | | | | | | 100% |
| | 극지현지 남극낫깃털이끼 in-field 테르페노이드 VOC 목록 확보 | | | | | | | | | | | | | 100% |
| | 극지현지 Open top chamber (OTC) 설치 온난화 모사조건의 남극낫깃털이끼 VOC 변화 확인 | | | | | | | | | | | | | 100% |
| 남극낫깃털이끼 VOC 생합성 유전자 기능성 규명 | 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 SuTPS in vitro 활성 검증 | | | | | | | | | | | | | 100% |
| | 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 SuTPS 과발현 모델 식물 제작 | | | | | | | | | | | | | 100% |
| | 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 유전자 SuTPS ex vivo 기능성 검증 | | | | | | | | | | | | | 100% |

□ 당초계획 □ 실적

나. 연구개발 목표별 달성도

| 성과목표 | 세부목표 | | 달성 주요내용 | 달성도(%) |
|----------------------------|------|---|---|--------|
| 남극낫깃털이끼 VOC 규명 | 1-1 | 남극낫깃털이끼 무균배양체의 테르페노이드 VOC 목록 확보 | - 남극 환경 모사조건에서 발현되는 남극낫깃털이끼 VOC 목록 확보 완료 - <u>말라리아 치료제 아르테미신 전구체</u> 등 남극낫깃털이끼 고유의 테르페노이드 물질 생성 규명 | 100% |
| | 1-2 | 극지현지 남극낫깃털이끼 in-field 테르페노이드 VOC 목록 확보 | - 극지현지 남극낫깃털이끼 in-field 테르페노이드 VOC 목록 확보 | 100% |
| | 1-3 | 극지현지 open top chamber (OTC) 설치 온난화 모사조건의 남극낫깃털이끼 VOC 변화확인 | - 극지현지 open top chamber (OTC) 기반 온난화 모사조건의 남극낫깃털이끼 VOC 목록 확보 | 100% |
| 남극낫깃털이끼 VOC 생합성 유전자 기능성 규명 | 2-1 | 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 SuTPS in vitro 활성 검증 | - 모델 식물 과발현 형질전환체 제작을 통한 ex vivo 기능성 연구 - 생합성 효소를 대장균에서 과량 발현 시킨 다음 in vitro 활성 검증 | 100% |
| | 2-2 | 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 SuTPS 과발현 모델 식물 제작 | - 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 SuTPS 8종 동정 - cDNA가 확보된 5종의 SuTPS 유전자의 과발현 애기장대 형질전환체 확보 완료 (당초 목표 2종 이상의 SuTPS 과발현체 확보) | 100% |
| | 2-3 | 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 유전자 SuTPS ex vivo 기능성 검증 | - SuTPS 과발현 애기장대 형질전환체의 테르페노이드 VOC 분석 완료 - 남극낫깃털이끼에서 고유하게 검출되었던 <u>말라리아치료제 아르테미시닌 전구체를 생성하는 SuTPS 동정 완료</u> - 확보한 연구결과의 특허출원 및 논문발표 중 | 100% |

다. 연구수행 세부 내용 및 결과

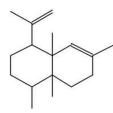
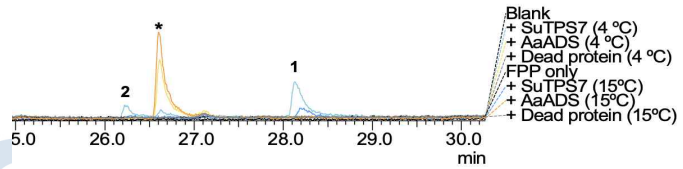
(1) 성과목표 1: 남극낫깃털이끼 테르펜 계열 VOC 대사물질 목록 규명

(가) 세부목표 1-1: 남극낫깃털이끼 극지현지 테르펜 계열 VOC 목록화

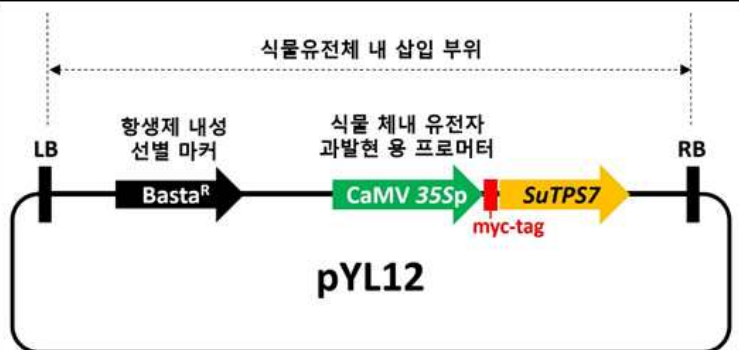
| 연구 내용 | 연구 결과 |
|--|--|
| 극지현지 남극낫깃털이끼 in-field 테르페노이드 VOC 목록 확보 | 세종기지 극지현지 남극낫깃털이끼 in-field 테르페노이드 VOC 포집 및 목록의 확보 완료함. |

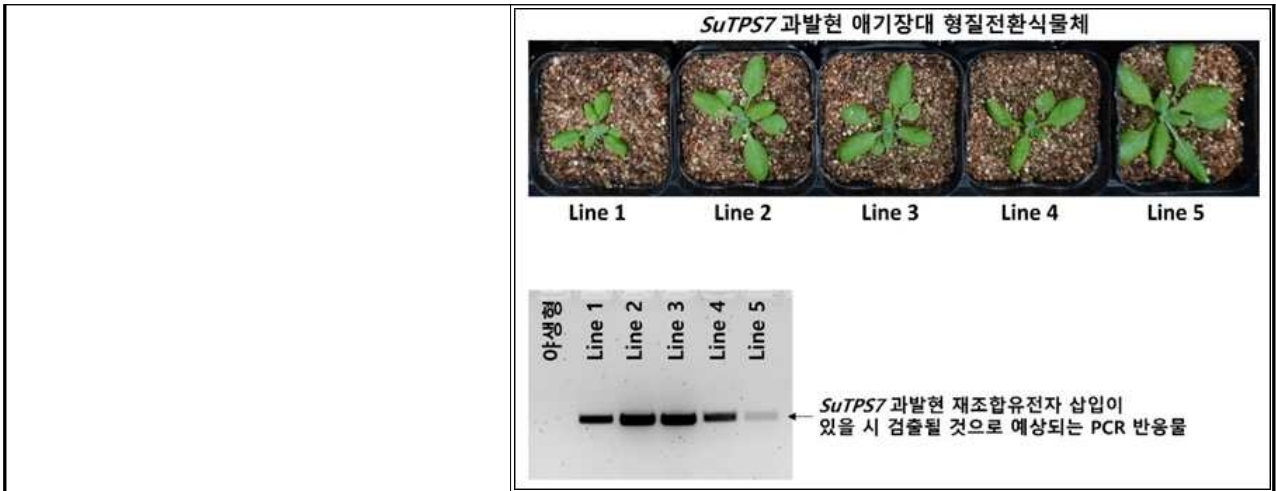
(2) 성과목표 2: 남극낫깃털이끼 테르펜 계열 VOC 물질 생합성 유전자 기능성 규명

(가) 세부목표 2-1: 남극낫깃털이끼 terpene synthase 효소 *in vitro* 활성 검증

| 연구 내용 | 연구 결과 |
|--|---|
| <p>남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 SuTPS <i>in vitro</i> 활성 검증</p> | <p>-모델 식물 애기장대 과발현 형질전환체 제작을 통한 SuTPS 유전자의 기능 검증 -담배에서 일시적인 단백질 과량발현을 통해 SuTPS 유전자의 기능 검증 -SuTPS 단백질을 대장균에서 대량생산하여 <i>in vitro</i> 활성 검증</p> <div style="text-align: center;">  <p>Amorpha-4,11-diene</p> </div>  |

(나) 세부목표 2-2: 남극낫깃털이끼 terpene synthase 과발현 모델 식물 제작

| 연구 내용 | 연구 결과 |
|--|--|
| <p>남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 과발현 형질전환 유전자 제작</p> | <p><i>SuTPS1</i>, <i>SuTPS2</i>, <i>SuMTPSL2</i> 과발현 형질전환 유전자 제작 완료함.</p> <div style="text-align: center;">  <p>pYL12</p> </div> |
| <p>남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 과발현 애기장대 형질전환체 제작</p> | <p><i>SuTPS1</i>, <i>SuTPS2</i>, <i>SuMTPSL2</i> 3종의 남극낫깃털이끼 terpene synthase 과발현 애기장대 형질전환체 제작 완료함.</p> |



(다) 세부목표 2-3: 남극낫깃털이끼 terpene synthase *ex vivo* 기능성 검증

| 연구 내용 | 연구 결과 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|----|----|-----|-----|----|----|------|-----|-----|
| <p>남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 과발현 애기장대 형질전환체에서의 형질전환유전자 발현량 확인</p> | <p>제작한 3종의 남극낫깃털이끼 terpene synthase 과발현 애기장대 형질전환체의 형질전환유전자 발현량 분석을 모두 완료함.</p> <table border="1"> <caption>SuTPS7 과발현 형질전환체 발현량</caption> <thead> <tr> <th>아생형</th> <th>Line 1</th> <th>Line 2</th> <th>Line 3</th> <th>Line 4</th> <th>Line 5</th> <th>Line 6</th> <th>Line 7</th> <th>Line 8</th> <th>Line 9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>~2</td> <td>~5</td> <td>~30</td> <td>~10</td> <td>~5</td> <td>~2</td> <td>~130</td> <td>~10</td> <td>~15</td> </tr> </tbody> </table> | 아생형 | Line 1 | Line 2 | Line 3 | Line 4 | Line 5 | Line 6 | Line 7 | Line 8 | Line 9 | 0 | ~2 | ~5 | ~30 | ~10 | ~5 | ~2 | ~130 | ~10 | ~15 |
| 아생형 | Line 1 | Line 2 | Line 3 | Line 4 | Line 5 | Line 6 | Line 7 | Line 8 | Line 9 | | | | | | | | | | | | |
| 0 | ~2 | ~5 | ~30 | ~10 | ~5 | ~2 | ~130 | ~10 | ~15 | | | | | | | | | | | | |
| <p>남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 과발현 애기장대 형질전환체에서의 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 VOC 물질 생성 확인</p> | <p>애기장대 형질전환을 통하여 남극낫깃털이끼에서 검출되었던 말라리아치료제 아르테미시닌 전구체 아모르파-1,4-디엔이 SuMTPSL2가 도입되었을 경우 생성됨을 확인함. 현재까지 아르테미시닌을 합성하는 개똥썩을 제외하고 테르펜생합성유전자 중 해당 물질을 생성하는 활성을 갖는 유전자로서는 최초 보고임. 이에 관한 특허 출원 및 논문 발표 중.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

라. 평가의 착안점

| 년도 | 성과목표 | 세부목표 | 가중치 | 평가의 착안점 및 척도 |
|------------|----------------------------|---|-----|--|
| 1차년도(2021) | 남극낫깃털이끼 VOC 규명 | 남극낫깃털이끼 VOC 판독 기술 확립 | 10 | 남극낫깃털이끼 VOC 포집 및 판독 기술의 확립 유무 |
| | 남극낫깃털이끼 VOC 생합성 관련 전사체 규명 | 남극낫깃털이끼, 서리이끼(비극지성) VOC 생합성 관련 전사체 판독 | 20 | 남극낫깃털이끼 극지 현지 및 실내 모사 조건에서의 SuTPS 유전자 발현 패턴 분석 여부 유무 |
| | | 극지 고유 VOC 생합성 경로 관련 유전자원 분류 | 20 | 남극낫깃털이끼 유전체 내 존재하는 테르페노이드 생합성 유전자 동정 및 정보 분석 유무 |
| 2차년도(2022) | 남극낫깃털이끼 VOC 규명 | 남극낫깃털이끼 무균배양체의 테르페노이드 VOC 목록 확보 | 15 | 남극낫깃털이끼 무균배양체의 테르페노이드 VOC 목록 확보 유무 |
| | | 극지현지 남극낫깃털이끼 in-field 테르페노이드 VOC 목록 확보 | 5 | 극지현지 남극낫깃털이끼 in-field 테르페노이드 VOC 목록 확보 유무 |
| | | 극지현지 open top chamber (OTC) 설치 온난화 모사조건의 남극낫깃털이끼 VOC 변화확인 | 5 | 극지현지 OTC 설치 실험 진행 여부 및 온난화모사 조건에서의 남극낫깃털이끼 테르페노이드 VOC 목록 확보 유무 |
| | 남극낫깃털이끼 VOC 생합성 유전자 기능성 규명 | 남극낫깃털이끼 SuTPS in vitro 활성 검증 | 5 | 합성된 단백질과 전구 물질만을 이용해서 TPS 단백질의 기능 검증 유무 |
| | | 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 SuTPS 과발현 모델 식물 제작 | 10 | SuTPS 유전자 과발현 애기장대 형질전환의 제작 유무 (2종 이상의 SuTPS 유전자 대상) |
| | | 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 유전자 SuTPS ex vivo 기능성 검증 | 10 | SuTPS 과발현 애기장대 형질전환체를 활용한 ex vivo 기능성 검증 유무 및 남극낫깃털이끼 유래 물질 생성 확인 유무 |

제 2 절 연구성과(정량적 성과)

1. 계획 대비 실적

(계획(건수)/대비(건수))

| 구분 | | 계획/실적 | | | | | |
|------------|-----|-------|-----|-----|-----|----|--|
| | | 국외 | | | 국내 | | |
| 논문 | SCI | 기타 | 소계 | SCI | 기타 | 소계 | |
| | 1/0 | / | 1/0 | / | / | / | |
| Proceeding | | 국외 | | | 국내 | | |
| | | / | | | / | | |
| 단행본(저서) | | / | | | | | |
| 특허 | 출원 | 국외 | | | 국내 | | |
| | 등록 | / | | | 0/1 | | |
| | | / | | | / | | |
| 기술실시계약 | | / | | | | | |
| 세미나개최 | | / | | | | | |
| 인터넷사이트 개설 | | / | | | | | |
| 기타사항 | | / | | | | | |

특허출원: [신규한 테르펜 합성효소 및 이의 용도]

발표 준비 중 논문: [Terpenoid volatile organic compounds and terpene synthases in Antarctic moss *Sanionia uncinata*]

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구 및 타 연구에의 응용

1. 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 물질 생물학적 기능 규명 연구

가. 테르펜 계열 물질은 자연계에서 생성되는 천연물의 가장 큰 부분을 차지하며 생물들이 주변 환경과의 상호작용에 활용하고 있는 2차 대사물질임(Tholl, 2015)

나. 남극낫깃털이끼는 극지 생태계가 유지되는데 토대를 제공하는 key species임(Rose *et al.*, 1996)

(1) 극지 현화식물들의 종자발아 및 성장 촉진

(2) 극지 소형 동물들의 안식처 제공

(3) 극지 미생물군집(microbiome) 형성

다. 남극낫깃털이끼의 생태적 지위는 남극낫깃털이끼와 극지 생물들 사이의 긴밀한 상호작용이 존재함을 의미함

라. 남극낫깃털이끼에서 검출한 테르펜 계열 VOC 대사물질은 남극낫깃털이끼와 극지 생물들과의 상호작용에서 중요한 역할을 하고 있을 것을 제안함

마. 특히 박테리아, 균류 등과의 상호작용에서 작동하는 테르펜 계열 VOC 물질의 동정은 새로운 항생제, 항균제 등으로 활용될 수 있는 유용 천연물 자원의 잠재성 지님

사. 본 연구를 통하여 아모르파디엔 및 남극낫깃털이끼 유래 테르펜 계열 VOC 물질 생성이 유도된 *35S::SuMTPS2* 애기장대 형질전환체를 활용하여 본과제 선행연구를 통하여 확보한 극지 미생물들과의 상호작용을 검증 가능한 실험적 시스템을 제공함

아. 동일한 개념으로 남극낫깃털이끼 terpene synthase 도입으로 테르펜 VOC 물질 대사체 변동이 유도된 추가 모델 식물들의 제작을 통하여 위의 추가 연구를 수행 가능

2. SuMTPSL2 단백질의 아르테미시닌 합성 대사공학 활용연구

- 가. 본 연구를 통하여 남극낫깃털이끼의 microbial TPS-like 효소인 SuMTPSL2가 남극낫깃털이끼에서 검출된 유래 테르펜 계열 VOC 물질 중 하나인 말라리아 치료제 아르테미시닌 전구체 아모르파디엔을 합성에 관여하고 있음을 규명
- 나. 아모르파디엔의 합성은 미생물에서의 아르테미시닌 합성 대사공학에서 key rate-limiting factor(Ro *et al.*, 2006)
- 다. 남극낫깃털이끼 SuMTPSL2는 개똥쑥의 ADS와 달리 sesquiterpene synthase 기질 farnesyl pyrophosphate로부터 아모르파디엔에 더하여 총 3종의 sesquiterpene 산물을 생성하는 것을 확인함
- 라. 이러한 SuMTPSL2 효소의 생화학적 promiscuity 원인을 ADS와의 비교 연구를 통하여 규명함으로써 테르펜 생합성 경로에 동작하는 효소들의 생화학적 작동기전 및 아르테미시닌 대량생산의 대사공학적 활용 방안 마련 가능(Lindahl *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2003; Mercke *et al.*, 2000)

3. 남극낫깃털이끼 SuTPS1, SuTPS2 효소의 기능 연구

- 가. 본 연구를 통하여 *SuMTPSL2*의 애기장대 과발현을 유도하였을 때 남극 유래 테르펜 계열 VOC 생성을 유도함을 확인
- 나. 이와는 대조적으로 SuTPS1, SuTPS2의 과발현은 애기장대에서 뚜렷한 대사체 변동을 유도하지 않는 것으로 확인됨
- 다. SuTPS1, SuTPS2의 생화학적 활성 규명을 위하여 애기장대에 비해 남극낫깃털이끼와 좀더 가까운 진화적 유연관계를 갖는 모델 이끼 식물 *Physcomitrium patens*에서 해당 남극낫깃털이끼 terpene synthase 도입 후 기능 규명 추가연구 수행
- 라. 위의 추가 연구를 통하여 제대로 이해되지 않은 남극낫깃털이끼 유래 유용 테르펜 계열 VOC 대사물질 생합성 경로 규명 가능

4. 남극낫깃털이끼 유래 타 분자 계열 VOC 유용 천연자원 추가 목록화

가. 자연계에서 생성되는 휘발성유기화합물 VOC의 종류는 에스터(ester) 계열, 알데히드(aldehyde) 계열, 락톤(lactone) 계열 등 본 연구에서 목록화한 테르펜 계열 외 더 존재함

나. 이러한 타 분자 계열 VOC 대사체 분석은 포집 방식에 있어서 테르펜 계열 VOC과 차이 존재하여 추가적인 분석이 필요함

| 흡착제 | 성질 |
|---------------|--|
| Porapak Q | C5~C12, 다양한 휘발성 유기물질의 흡착에 적합, 극성을 띠거나 물 같은 작은 분자 흡착력이 낮음 |
| Porapak N | C5~C8, 나이트릴, 알코올을 포함하는 휘발성 유기물질 흡착에 적합 |
| Tenax TA | C7~C26, 테르펜 분석에 적합 |
| Chromosorb102 | 산소를 포함하고 있는 유기 휘발성 물질 흡착에 적합 |
| Carbotrap | C5~C12, 케톤, 알코올, 알데히드 흡착에 적합 |
| Carboxen100 | C2~C5, 작은 휘발성 유기물질 흡착에 적합 |

표2. VOC 포집 흡착제 종류 및 그 성질

극지연구소

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 2 절 남극낫깃털이끼의 극지 생태계 지위 연구

1. 남극낫깃털이끼는 남극 식생을 우점하는 key species 중 하나임
2. 최근 지구온난화에 따른 극지 식생의 급격한 변화로 남극낫깃털이끼의 생태계 지위에 대한 이해의 중요성이 제기됨
3. Newsham *et al.* 은 극지 조사 현장에서의 open-top chamber (OTC) 설치를 활용하여 기온 상승에 따라 이끼류들이 소형 동물들을 유인하는 효과 보고
4. Park *et al.* 은 남극낫깃털이끼 체내에 형성되는 endophytic bacterial community에 관한 연구결과를 보고
5. Camara *et al.* 은 남극낫깃털이끼 gametophyte 표면에 형성하는 pathogen community에 관하여 보고
6. Tojo *et al.* 은 남극낫깃털이끼를 감염하는 난균류(oomycete)에 관하여 보고
7. Casanova-Kanty *et al.* 은 남극낫깃털이끼 군집에 의해서 극지 현화식물들의 극지 환경 적응 증진 현상을 보고
8. Menezes *et al.* 은 남극낫깃털이끼에서 동정된 균류들의 병증 발현 요인들에 관하여 보고

제 2 절 신규한 식물 terpene synthase 집단 규명

1. 식물 테르펜 합성 연구는 현화식물군의 TPS 효소들에 집중되어 수행되었음
2. 최근 이루어진 유전체 대량생물정보 축적으로 인하여 조류(algae)부터 진 육상식물군에 존재하는 TPS 효소들에 대한 분류 동정 작업이 새롭게 이루어짐

3. 이러한 연구를 통하여 이끼류, 양치류 등을 포함하는 non-seed plant lineage에서만 특이적으로 탐색되는 TPS clade가 규명됨
4. 해당 TPS clade는 단백질의 구조적 특성 및 아미노산 서열 등에서 식물군에 존재하는 다른 TPS 효소들에 비해 박테리아, 균류에서 탐색되는 TPS 효소들과 더 높은 유사성을 나타냄
5. 이를 토대로 해당 TPS clade를 microbial TPS-like (MTPSL)로 신규 분류함
6. MTPSL은 현화식물 등 seed plant를 제외한 식물분류군의 종들의 생활사에서 중요한 생물학적 기능을 담당하고 있을 것으로 추정되나 이에 관한 연구는 오랫동안 잘 이루어지지 않았음
7. 그러나 최근 테네시 대학의 Feng Chen 그룹 등에서 MTPSL의 생화학적, 생물학적 기능에 관한 연구를 활발히 수행 중(Jia *et al.*, 2016)
8. Imbiscuso *et al.* 은 양치식물에서 초식곤충의 섭식작용에 반응하여 유도되는 테르펜 계열 VOC 대사체 분석을 보고함
9. Hu *et al.* 은 이끼 *Stereodon subimponens*에서 MTPSL 효소의 생화학적 활성 분석 보고

제 7 장 참고문헌

- Camara, P.E.A.S., Eisenlohr, P.V., Coelho, L.C., Carvalho-Silva, M., Amorim, E.T., Convey, P., Pinto, O.H.B., and Rosa, L.H. (2021). Fairy ring disease affects epiphytic algal assemblages associated with the moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske (Bryophyta) on King George Island, Antarctica. *Extremophiles* 25, 501-512. 10.1007/s00792-021-01246-9.
- Casanova-Katny, M.A., and Cavieres, L.A. (2012). Antarctic moss carpets facilitate growth of *Deschampsia antarctica* but not its survival. *Polar Biol* 35, 1869-1878. 10.1007/s00300-012-1229-9.
- Choi, K., Kim, J., Hwang, H.J., Kim, S., Park, C., Kim, S.Y., and Lee, I. (2011). The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in *Arabidopsis*, by recruiting chromatin modification factors. *Plant Cell* 23, 289-303. 10.1105/tpc.110.075911.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743. 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.
- Connolly, J.D., and Hill, R. (1991). *Dictionary of terpenoids* (Chapman & Hall).
- de Menezes, G.C.A., Alves, R.P., Victoria, F.D., Putzke, J., Pereira, A.B., and de Albuquerque, M.P. (2019). Study of physiological and enzymatic properties and characterization of pathogenic activity of a fungus isolated from moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske in Antarctica. *Polar Biol* 42, 783-792. 10.1007/s00300-019-02473-9.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., and Krishna, S. (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 424, 957-961. 10.1038/nature01813.
- Fang, X., Li, J.X., Huang, J.Q., Xiao, Y.L., Zhang, P., and Chen, X.Y. (2017). Systematic identification of functional residues of *Artemisia annua* amorpha-4,11-diene synthase. *Biochem J* 474, 2191-2202. 10.1042/BCJ20170060.

- Gao, Y., Honzatko, R.B., and Peters, R.J. (2012). Terpenoid synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis. *Nat Prod Rep* *29*, 1153–1175. 10.1039/c2np20059g.
- Gershenzon, J., and Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* *3*, 408–414. 10.1038/nchembio.2007.5.
- Huang, J.Q., and Fang, X. (2021). Amorpha-4,11-diene synthase: a key enzyme in artemisinin biosynthesis and engineering. *Abiotech* *2*, 276–288. 10.1007/s42994-021-00058-x.
- Jia, Q., Kollner, T.G., Gershenzon, J., and Chen, F. (2018). MTPSLs: New Terpene Synthases in Nonseed Plants. *Trends Plant Sci* *23*, 121–128. 10.1016/j.tplants.2017.09.014.
- Jia, Q., Li, G., Kollner, T.G., Fu, J., Chen, X., Xiong, W., Crandall-Stotler, B.J., Bowman, J.L., Weston, D.J., Zhang, Y., et al. (2016). Microbial-type terpene synthase genes occur widely in nonseed land plants, but not in seed plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 12328–12333. 10.1073/pnas.1607973113.
- Koksal, M., Jin, Y., Coates, R.M., Croteau, R., and Christianson, D.W. (2011). Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature* *469*, 116–120. 10.1038/nature09628.
- Lesburg, C.A., Zhai, G., Cane, D.E., and Christianson, D.W. (1997). Crystal structure of pentalenene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* *277*, 1820–1824. 10.1126/science.277.5333.1820.
- Li, G., Kollner, T.G., Yin, Y., Jiang, Y., Chen, H., Xu, Y., Gershenzon, J., Pichersky, E., and Chen, F. (2012). Nonseed plant *Selaginella moellendorffii* [corrected] has both seed plant and microbial types of terpene synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 14711–14715. 10.1073/pnas.1204300109.
- Lindahl, A.L., Olsson, M.E., Mercke, P., Tollbom, O., Schelin, J., Brodelius, M., and Brodelius, P.E. (2006). Production of the artemisinin precursor amorpha-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* *28*, 571–580. 10.1007/s10529-006-0015-6.

- Martin, V.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D., and Keasling, J.D. (2003). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol* 21, 796-802. 10.1038/nbt833.
- Mercke, P., Bengtsson, M., Bouwmeester, H.J., Posthumus, M.A., and Brodelius, P.E. (2000). Molecular cloning, expression, and characterization of amorpha-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys* 381, 173-180. 10.1006/abbi.2000.1962.
- Miller, L.H., and Su, X. (2011). Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell* 146, 855-858. 10.1016/j.cell.2011.08.024.
- Newsham, K.K., Hall, R.J., and Maslen, N.R. (2021). Experimental warming of bryophytes increases the population density of the nematode *Plectus belgicae* in maritime Antarctica. *Antarct Sci* 33, 165-173. Pii S095410202000052810.1017/S0954102020000528.
- Ochyra, R., Lewis Smith, R.I., and Bednarek-Ochyra, H. (2008). The illustrated moss flora of Antarctica (Cambridge University Press).
- Paddon, C.J., Westfall, P.J., Pitera, D.J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M.D., Tai, A., Main, A., Eng, D., et al. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496, 528-532. 10.1038/nature12051.
- Park, M., Hong, S.G., Park, H., Lee, B.H., and Lee, H. (2018). Identification of reference genes for RT-qPCR in the Antarctic moss *Sanionia uncinata* under abiotic stress conditions. *Plos One* 13. ARTN e019935610.1371/journal.pone.0199356.
- Park, M., Lee, H., Hong, S.G., and Kim, O.S. (2013). Endophytic bacterial diversity of an Antarctic moss, *Sanionia uncinata*. *Antarct Sci* 25, 51-54. 10.1017/S0954102012000806.
- Ro, D.K., Paradise, E.M., Ouellet, M., Fisher, K.J., Newman, K.L., Ndungu, J.M., Ho, K.A., Eachus, R.A., Ham, T.S., Kirby, J., et al. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440, 940-943. 10.1038/nature04640.
- Ross, R.M., Hofmann, E.E., Quetin, L.B., and American Geophysical, U. (1996). Foundations for ecological research West of the Antarctic Peninsula (American Geophysical Union).

- Rynkiewicz, M.J., Cane, D.E., and Christianson, D.W. (2001). Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13543-13548. 10.1073/pnas.231313098.
- Starks, C.M., Back, K., Chappell, J., and Noel, J.P. (1997). Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-*epi*-aristolochene synthase. *Science* *277*, 1815-1820. 10.1126/science.277.5333.1815.
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Adv Biochem Eng Biot* *148*, 63-106. 10.1007/10_2014_295.
- Tojo, M., Van West, P., Hoshino, T., Kida, K., Fujii, H., Hakoda, A., Kawaguchi, Y., Muhlhauser, H.A., Van den Berg, A.H., Kupper, F.C., et al. (2012). *Pythium polare*, a new heterothallic oomycete causing brown discolouration of *Sanionia uncinata* in the Arctic and Antarctic. *Fungal Biol-Uk* *116*, 756-768. 10.1016/j.funbio.2012.04.005.
- Westfall, P.J., Pitera, D.J., Lenihan, J.R., Eng, D., Woolard, F.X., Regentin, R., Horning, T., Tsuruta, H., Melis, D.J., Owens, A., et al. (2012). Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, E111-118. 10.1073/pnas.1110740109.

뒷 면

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.