

*Agrobacterium*으로 형질전환시킨 갈퀴꼭두선이의 세포배양에 의한 천연염료생산

신순희 · 김유선 · 김승혜
덕성여자대학교 약학대학

Production of Anthraquinone Derivatives by *Rubia cordifolia* var.
pratensis Transformed by *Agrobacterium* spp.

Soon-Hee Shin, You Sun Kim and Seung Hye Kim

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract—The cells of *Rubia cordifolia* var. *pratensis* were transformed by *Agrobacterium tumefaciens* strain 11157. Surface-sterilized young leaves and stems of the plants were cocultivated with bacterial suspensions. Crown galls induced from stems were cultured with variation of culturing conditions and compared with untransformed cells. The growth rates and production of anthraquinone pigments of cells were remarkably improved by transformation. Furthermore, hairy roots were induced by inoculation or cocultivation with *Agrobacterium rhizogenes* strains.

Keywords—*Rubia cordifolia* var. *pratensis* · *Agrobacterium tumefaciens* · crown gall · *Agrobacterium rhizogenes* · hairy root · anthraquinone pigments · alizarin · purpurin

갈퀴꼭두선이 (*Rubia cordifolia* var. *pratensis* Max.)는 Rubiaceae에 속하는 다년생 초본으로 꼭두선이와 함께 중요한 천연염료 자원이며, 한방에서 정혈, 지혈, 통경 등의 목적으로 사용된다.¹⁻³⁾

이 식물의 뿌리에 함유된 anthraquinone 화합물인 alizarin, purpurin, ruberythric acid 등은 우수한 천연염료이나, 제한된 식물재료 및 색소의 낮은 함유율 등으로 생산단가가 상당히 높다. Suzuki 등은 식물조직배양법에 의한 이들 *Rubia* 속 식물색소의 생산에 대한 연구를 한 바 있으며, 저자 등은 한국에 흔히 자생하는 꼭두선이 및 갈퀴꼭두선이의 어린잎으로부터 callus를 유도, 배양하여, 배양조건에 따른 색소생성을 비교하고, 배양 적정조건에 대해 보고한 바 있는데, 이 실험에서 꼭두선이 보다 특히 갈퀴꼭두선이

에서 유도된 callus가 높은 색소생성을 나타내는 것을 확인하였다.⁴⁻⁷⁾

그러나 미분화된 callus 및 cell line의 경우 높은 색소생성능을 그대로 유지시키기 어렵다. 이와 관련하여 근래에 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 방법이 이미 여러 식물에서 시도되고 있다.⁸⁻¹⁵⁾

이에 본 연구에서는 식물세포의 분열 및 성분 생산속도를 더욱 획기적으로 개선시키려는 목적으로, 갈퀴꼭두선이의 세포에 *Agrobacterium* 속 균의 Ti 및 Ri-plasmid를 도입하여 형질전환시킨 세포를 배양함에 있어서의 적정조건을 알아내기 위해, 여러조건에서 비교실험하였고, 특히 *A. tumefaciens* strain 11157로 형질전환시킨 세포의 배양으로 색소생산성을 현저히 상승시킬 수 있었기에 보고하는 바이다.

실 험 방 법

식물재료—1991년 11월 덕성여대 약초원(상계동)에 야생하는 갈퀴꼭두선이 *Rubia cordifolia* var. *pratensis*의 열매 및 싹눈이 붙은 근경을 채취하여 열매는 흐르는 물로 세척한 후, 일부는 묘판에 심어서 온실에서 발아시키고 나머지는 sodium hypochlorite로 소독하여 젖은 여지를 칸 petri dish에 놓아 26°C, 암소에서 무균발아시켰다. 채집한 근경은 화분에 심어 온실에서 싹을 키우기 시작하여 약 30일이 경과한 후부터 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 실험의 재료로 사용하였다.

Callus 유도 및 계대배양—무균발아시킨 어린 싹 및 온실에서 발아시킨 어린 잎을 잘라, 70% EtOH로 1회, 0.5% hypochlorite로 3회, 멸균증류수로 5회 세척한 후, 이미 수행된 바 있는 저자 등의 연구에서 갈퀴 꼭두선이 callus의 생장 및 색소생산의 적정조건으로 밝혀진 조건(25°C, 2,4-D 2ppm, kinetin 5ppm을 포함한 MS medium)에서 callus을 유도하고 계대배양하였다.

*Agrobacterium*에 의한 형질전환

***Agrobacterium*의 배양 및 직접접종법에 의한 형질전환**—*A. rhizogenes* A₄(ATCC)는 분말 tablet로 구입한 것을 LB액체배지에 분산시킨 후 25°C에서 24시간 진탕배양하여, LB고체배지(Bacto trypton 10.0 g/l, Bacto yeast extract 5.0 g/l, sucrose 10.0 g/l, Bacto agar 14.0 g/l)에 도말하여 petri dish상에서(25°C, 72시간) 배양하고, *A. rhizogenes* strain 15834는 한국중균협회에서 분양받아 위의 LB액체배지의 조성중 sucrose 대신에 NaCl 10 g/l를 첨가한 배지를 조제하여 A₄와 같은 조건으로 배양하였다. 식물에 균의 plasmid를 도입시키는 방법으로는 갈퀴꼭두선의 어린잎은 callus 유도시와 같은 방법으로 소독하고, 줄기는 마디부분을 포함하여 3~5 cm 정도로 절단된 부분을 순간접착제로 봉쇄한 후 소독하였다. 잎의 표면과 줄기의 측면에 바늘로 상처를 낸 후 균을 도말하는 방법으로 균을 접종시킨 후 항생제로 claforan 400 mg/l를 첨가하고, 생장효능은 전혀 첨가하지 않은 MS배지에

이식하고 3~14일 간격으로 같은 조성의 새로운 배지로 교체하는 것을 5회정도 반복한 후, 기본 MS 배지상에서 배양을 계속하였다.

줄기와 균의 공존 배양법—위의 직접접종법에서와 같은방법으로 소독한 줄기를 1 cm 정도로 잘라 미리 액체 LB 배지에 배양한 균액에 넣고, shaking incubator 내에서 진탕시켰다. 적절한 균접촉시간을 알아내기 위하여 진탕시간을 10 min과 24시간의 두가지로 실험하여 결과를 비교하여 보았다. 균과 반응시킨 sample은 핀셋으로 건져서 멸균한 여과지로 표면을 닦은 후, claforan 400 mg/l 첨가한 MS 한천배지에 이식하고, 26°C, 암소에 방치하고 1주 간격으로 새로운 배지로 교체하여 주며 hairy root의 형성을 관찰하였다.

Cell suspension 및 callus로부터의 hairy root 유도—Hairy root 유도의 빈도수를 늘리기 위한 방법을 찾으려는 목적으로 callus 및 cell suspension에 세포막 용해제를 사용하는 방법을 실험하였다. 앞에서 계대배양한 callus를 MS 액체배지에 48시간 진탕배양한 후, 꺼즈 두점을 깔때기에 깔아 여과하고 이것을 2% cellulose, 0.5% pectinase, 0.3% mannitol을 포함한 액체 배지에 넣어 shaking incubator에서 2시간동 안 진탕한 후 여과하여 멸균수로 세척하고 LB 액체 배지에 배양한 *Agrobacterium rhizogenes* A₄의 suspension에 넣어 15시간 진탕배양하여 균을 감염시켰다. 이것을 여과하고 항생제 포함 MS배지에 이식하여 25°C 암소에 방치하였다.

***A. tumefaciens*에 의한 crown gall의 유도 및 배양**—한국중균협회에서 분양받은 *A. tumefaciens* strain 11157 및 15955을 LB 배지에 *A. rhizogenes*의 경우와 같은 방법으로 배양하여, 갈퀴꼭두선의 줄기에 직접 접종시키고 항생제 배지위에 정치하여 25°C, 암소에서 배양한 결과, 균 접종으로부터 약 14일 경과 후 부터 crown gall이 형성됨을 관찰할 수 있었다. 유도된 crown gall을 계대배양하여, 성장조절제로 kinetin 5ppm과 NAA 2ppm을 첨가한 배지와 성장조절제를 전혀 첨가하지 않은 배지에 이식한 후, 이것의 생장속도 및 색소생성을 형질전환 시키지 않은 callus와 비교하였다. 형질전환의 확인은 strain

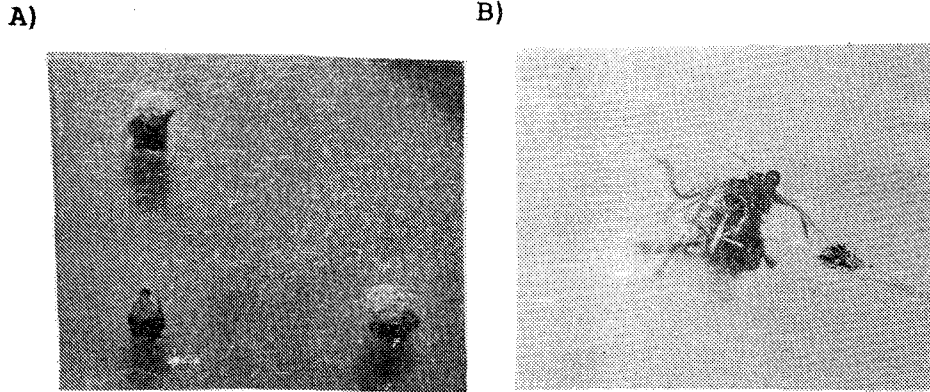


Fig. 1. Crown galls (A) and hairy roots (B) induced from *Rubia cordifolia* var. *pratensis*

11157이 octopine 형성균주이므로, 유도된 crown gall의 50% ethanol 추출액을 표준품(octopine, Sigma)과 같이 formic acid : acetic acid : water (5 : 15 : 80)을 buffer로 하여 300 volt에서 전기영동하고, 0.04% phenanthraquinone 및 10% NaOH를 분무하고 UV 장파장으로 황색형광을 확인하였다.

생성 색소량의 측정—Hewlett Packard 8452A Diode Array spectrophotometer를 사용하여, alizarin 및 purpurin 표준의 EtOH 용액으로 433 nm 및 516 nm에서의 검량곡선을 그린후, 일정 조건에서 배양중인 callus 및 *A. tumefaciens*에 의해 형질전환된 세포괴(crown galls)를 8~10 일 간격으로 채취하여 무게를 측정후 유발에서 EtOH과 함께 갈아서 여과하여, 그 여액의 흡광도를 434 nm에서 측정하여 생성된 총 황색소량을 계산하고, 516 nm에서는 purpurin을 정량하였다. 이 액에 1N-NaOH를 가한 후, 566 nm에서 측정된 흡광도를 alizarin의 양으로 환산하였다.

실험 결과 및 고찰

실험조건에 따른 hairy root 및 crown gall의 형성 비율—일 것으로 부터는 hairy root가 형성되지 않았으며, 줄기의 경우 균감염 후 8~12일 경부터 생기기 시작하였다(Fig. 1, A). 직접 접종법으로 실험한 경우, 약 200개의 sample중 8개에서 hairy root가 형성되었으며, 8개는 callus

화 되었다. 균과의 공존배양의 결과로는 10개의 hairy root가 형성되었다. 또한 항생제 처리의 적정시점을 알아보기 위하여, 균처리 후 약 40일간 항생제를 첨가하지 않은 MS 배지에 배양한 후에 항생제배지로 바꾸어준 경우 30개의 sample중 5개에서 hairy root의 형성이 관찰되었으며, 색소가 생성됨을 확인하였다. 배양한 *A. tumefaciens*를 줄기에 직접 접종하였을 때와 균의

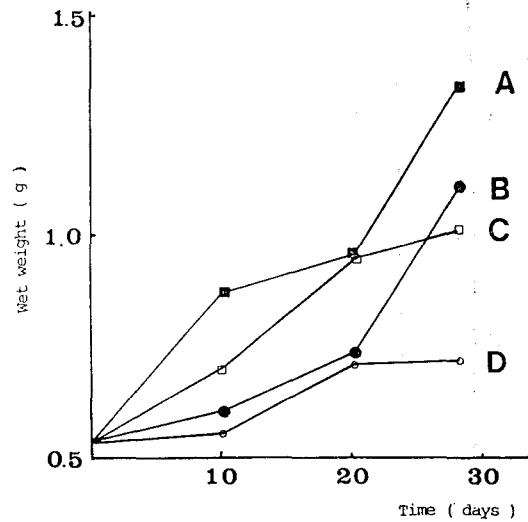


Fig. 2. Growth curves
 A : Crown galls induced by *A. tumefaciens* on MS medium with NAA(2ppm) and kinetin (5ppm)
 B : Non-transformed callus on MS medium with NAA(2ppm) and kinetin(5ppm)
 C : Crown galls induced by *A. tumefaciens* on MS medium without plant growth hormones
 D : Non-transformed callus on MS medium without plant growth hormones

suspension과 줄기의 절편을 15분간 공존배양 했을 때의 crown gall 형성율은 각각 23%, 40%로, 균집축일로부터 약 30일 경과 후에 관찰되었다(Fig. 1, B).

Agrobacterium tumefaciens strain 11157로 형질전환시킨 갈퀴꼭두선이 세포(crown gall)의 성장속도—Crown gall의 성장속도는 같은 조건에서 배양한 형질전환되지 않은 세포에 비해 전반적으로 높은 성장속도를 나타내었으며, 식물생장조절물질(2ppm NAA, 5ppm kinetin)의 첨가는 두가지 경우에 모두 생성속도를 증가시켰다. 특히, 28일 배양 후의 결과를 비교해 보면 crown gall은 생장조절 물질을 전혀 첨가하지 않은 배지에서, 형질전환 시키지 않은 callus에 비해 현저하게 높은 증량증가를 나타내며, 이 증량은 생장조절제 첨가배지에서 배양한 callus와 비교해서도 큰 차이가 없다는 것이 주목되었다(Fig. 2).

색소 생성—앞서 채취하여 증량측정한 crown

gall 및 형질전환 시키지 않은 callus에 생성된 총 황색색소의 양을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 색소형성은 전반적으로 배양 20일 후 부터 현저히 증가하였고 crown gall은 같은 조건에서 배양한 callus에 비해 약 2 내지 5배의 색소를 형성하였다. 특히 주목할만한 결과는 생장조절제를 전혀 첨가하지 않은 배지에서 배양한 crown gall이 생산한 총 황색색소량 (Fig. 3, C)이, 생장조절제를 첨가한 배양한 callus에서 (Fig. 3, B)보다 1.9배 이상 높다는 것이다.

배양 28일 후 생성된 alizarin(Fig. 4, B) 및 purpurin (Fig. 4, C)의 양을 측정하여 비교한 결과, 이 경우에도 역시 crown gall의 색소 생성이 현저히 높은 것으로 나타났다. 한편 생성된 총 황색소 중 alizarin이 차지하는 비율은 조건에 따라 차이를 보였는데 24~60% 정도인 것으로 나타났다(Fig. 4).

Rubia속 식물의 색소 중에서도 응용면에서 중요성이 큰 색소인 purpurin의 생성량의 배양시간

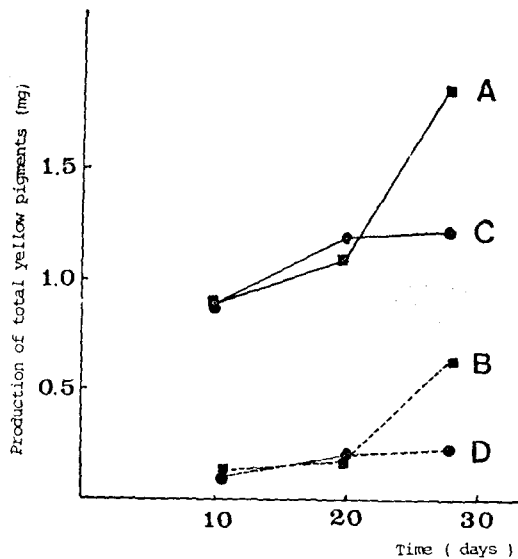


Fig. 3. Production of total yellow pigments
 A : Crown galls induced by *A. tumefaciens* on MS medium with NAA(2ppm) and kinetin (5ppm)
 B : Non-transformed callus on MS medium with NAA(2ppm) and kinetin(5ppm)
 C : Crown galls induced by *A. tumefaciens* on MS medium without plant growth hormones
 D : Non-transformed callus on MS medium without plant growth hormones

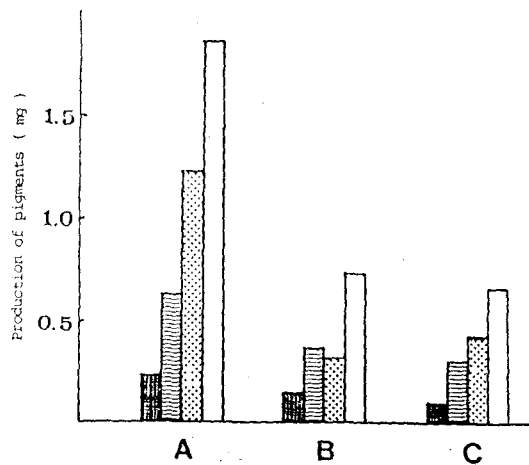


Fig. 4. Production of pigments in crown galls and callus after incubation 28 days
 A : total pigments, B : alizarin, C : purpurin
 ■ Non-transformed callus on MS medium without plant growth hormones
 ▨ Non-transformed callus on MS medium with NAA(2ppm) and kinetin(5ppm)
 ▩ Crown galls induced by *A. tumefaciens* on MS medium without plant growth hormones
 □ Crown galls induced by *A. tumefaciens* on MS medium with NAA(2ppm) and kinetin(5ppm)

Table I. Concentration(%) of produced purpurin

Condition	Duration of Cultivation		
	10 days	20 days	28 days
A	0.05	0.06	0.05
B	0.02	0.02	0.03
C	0.07	0.10	0.04
D	0.01	0.03	0.02

A: Crown galls induced by *A. tumefaciens* on MS medium with NAA(2ppm) and kinetin(5ppm).
 B: Non-transformed callus on MS medium with NAA(2ppm) and kinetin(5ppm).
 C: Crown galls induced by *A. tumefaciens* on MS medium without plant growth hormones.
 D: Non-transformed callus on MS medium without plant growth hormones.

및 조건에 따른 변화를 세포 중량에 대한 percent 로 계산하여 비교한 결과, 배양 20일 후에 형질 전환시킨 세포를 생장조절제 첨가배지에 배양한 경우 (C)가 0.10%로 가장 높게 나타났으며, 이러한 비교에서는 오히려 crown gall이 callus에 비해 생성비율이 높은 결과로 나타난 것도 있으나, 이러한 결과는 crown gall의 높은 증식속도로 인하여 sample 한개당의 현격한 증량의 증가에 기인하는 것으로, sample 1개당의 purpurin 생성량은 crown gall의 경우가 현저히 높다(Table I).

결 론

갈퀴꼭두선이의 세포를 *Agrobacterium tumefaciens* strain 11157로 형질전환시켜 형성된 crown gall을 배양하여, 일정조건에서 배양하여 형질전환 시키지 않은 callus와 비교해본 결과, 현저하게 높은 세포 증식율 및 색소생산의 결과를 얻었으며, 한편 *A. rhizogenes* A₄로 hairy root를 유도하여 색소형성을 관찰하였다.

감사의 말씀—이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구

조성비에 의하여 연구 되었음.

〈1992년 8월 31일 접수 : 9월 4일 수리〉

문 헌

1. 幸昌福 : 大韓植物圖鑑, 鄉文社, p.657 (1979).
2. 金在佶 : 原色天然藥物大事典, 南山堂, 上 p.174 (1984).
3. 陳存仁 : 圖說漢方醫學大事典, 東都文化社, 제 2 권, pp.182-185 (1984).
4. Suzuki, H., Matsumoto, T. and Mikami, Y.: *Agric. Biol. Chem.* 48, 603 (1984).
5. Itokawa, H., Mihara, K. and Takeya, K.: *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2352 (1983).
6. Shin, S.H. and Chi, H.J.: Current Studies on Tissue Culture of Some medicinal Plants in Korea. *Proc. Int. Sym. on New Drug Development from Natural Products*, 79 (1989).
7. Shin, S.H.: *Arch. Pharm. Res.* 12, 99 (1989).
8. Yoshikawa, T. and Furuya, T.: *Plant Cell Reports* 6, 449 (1987).
9. Aird, E.L.L.H., Hamill, J.D. and Rhodes, M.J.C.: *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 25, 47 (1988).
10. Kamada, H., Ckamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura K.: *Plant Cell Reports* 5, 239 (1986).
11. Knopp, E., Straus, A. and Wehrli, W.: *Plant Cell Reports* 7, 590 (1988).
12. Grierson, D. and Covey, S.N.: *Plant Molecular Biology*, Blakie, p.141 (1988).
13. Gelvin, S.W.B. and Schilperoort, R.A.: *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publisher, A₃/11, (1988).
14. Robins, R.J., Hamill, J.D., Parr, A.J., Smith, N.J. Walton, N.J. and Rhodes, M.J.: *Plant Cell Reports* 6, 122 (1987).
15. Ko, K.S., Heo, I.O., Yang, K.P., Lee, W.J., Kim, C.M. and Jo, P.H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 22, 26 (1991).