

수종의 Elicitor 및 Amino Acid가 배양세포내 Taxane 유도체의 생산에 미치는 영향

신승원*, 임 숙

덕성여자대학교 약학대학

Effects of Several Elicitors and Amino Acids on Production of Taxane Derivatives in Cultured Cells

Seung-Won Shin* and Sook Lim

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

Abstract – To develop new elicitors inducing the high productivity of taxane derivatives, plant growth inhibitors, namely, maleic acid hydrazide, N-phosphomethyl glycine and succinic acid 2,2-dimethyl hydrazide, coconut milk and yeast extract were administrated in the cell suspension culture system of *Taxus cuspidata*, and the production of baccatin III were analysed. The effects of amino acid related with the biosynthesis of baccatin III were also examined in these culture system. As the results, a remarkable enhancement of baccatin III production was observed in the cultivation with coconut water and with maleic acid hydrazide.

Key words – Baccatin III; *Taxus cuspidata*; cell suspension culture; signal transduction; elicitor; phenyl alanine; tyrosine; yeast extract; jasmonic acid; coconut water; maleic acid hydrazide; N-phosphomethyl glycine; succinic acid 2,2-dimethyl hydrazide

식물이 외부환경의 변화를 인지하는데 있어서 특별한 receptor가 존재하며, 식물은 이러한 자극에 대해 고유한 신호전달체제를 통해 반응한다는 사실이 이미 여러 식물에서 확인 되었고 그 mechanism이 연구된 바 있다.^{1,2)} 식물의 이차 대사산물 중 상당수가 외부공격에 대한 방어물질로써의 의미가 있는 것으로 알려져 있으며, 외부공격에 잇따른 유전자 발현, 2차 대사산물의 합성사이에서의 신호전달물질로 oxylipin 등의 유도체가 관여하는 것으로 알려져 있다. Oxylipin 유도체인 jasmonate는 식물이 미생물이나 곤충에 의해 공격받았을 때 식물 세포막에서 일시

적으로 생산되는 대표적인 물질로 수종의 배양세포에서 균세포막의 추출물에 의해 유도됨이 확인된 바 있다.³⁻⁵⁾

Mirjalili 등은 세포내 taxane 유도체의 생산성을 높이는 새로운 방법으로 *Taxus cuspidata*의 세포 현탁 배양계에 신호전달물질인 methyl jasmonate 및 ethylene를 동시에 처리한 결과, taxol의 생산량을 약 15배 증가시켰으며, Yukimune 등은 *T. baccata*, *T. brevifolia* 등 주목류의 세포 현탁배양액에 methyl jasmonate 및 jasmonic acid 구조 유사체를 투여했을 때 taxol 및 baccatin III의 생산량이 현저하게 증가하는 결과를 보고하였다. 이 때 taxane 유도체의 생성량은 종에 따라 현저한 차이를

*교신저자 : Fax 02-901-8386

나타냈다.^{6,9)}

현재 taxol은 주로 *T. brevifolia*의 수피로부터 분리 생산되나, 수율이 적고 원료공급에 제한을 받아 수피 이외의 부분, 즉 잎, 어린 가지 등에서의 추출방법, 수율을 향상시키기 위한 새로운 추출법, 씨눈으로부터의 세포배양법, 다양한 식물자원의 개발 및 taxol을 생산하는 미생물 배양을 이용한 제조법 등이 개발되어 활용되고 있다.¹⁰⁻¹³⁾

그러나 기존의 생산법에 의한 taxol이 아직도 고가이므로, 보다 효율적, 경제적인 taxol 생산법의 개발은 여전히 세계적인 관심사이며, 특히 생합성 전단계 물질이며, 배양세포로부터의 수율이 높은 baccatin III 및 10-deacetyl baccatin III를 추출하여 taxol을 반합성하는 방법에 많은 기대를 걸고 있다.¹⁴⁾

본 논문에서는 저자 등이 전보^{15,16)}에 보고한 바와 같은 본 실험실에서 선별한 baccatin III 생산성이 높은 한국산 주목(*Taxus cuspidata*)의 cell line을 이용하여, 기존의 알려진 물질들보다 경제적이며, 수용성이 강한 inducer 또는 elicitor를 개발하기 위한 목적으로, yeast extract, coconut water, maleic acid hydrazide N-phosphomethyl glycine, succinic acid 2,2-dimethyl hydrazide 등의 첨가가 배양 세포내의 baccatin III 생산량에 미치는 영향을 검토하였다. 한편 이 배양계에 baccatin III 구조 생합성 과정에서 benzoyl기 도입과 관련된 것으로 예상되는 phenyl alanine, tyrosine 등의 amino acid를 첨가¹⁷⁾하여 baccatin III 생산성의 증가를 가져올 수 있는가를 알아보기 위한 실험을 하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

배지 - B₅ 배지¹⁸⁾의 기본조성에 2,4-dichloro phenoxy acetic acid와 kinetin을 각각 1 ppm 씩 첨가하여 pH를 5.75로 조정 한 후 casein 1 g/l, sucrose 20 g/l를 가하여 제조한 배지를 control로 사용하였다. 이렇게 제조한 B₅ 배지 500 ml 씩에 taxane 유도체 생합성의 elicitor screening 대상 물질로 yeast extract(Difco, 100 mg), coconut water(Sigma, 50 ml), maleic acid hydrazide(Sigma, 0.5 g), N-phosphomethyl glycine(0.5 g), succinic acid 2,2-dimethyl hydrazide(0.5

g)를 각각 가하여 비교실험용 배지로 하였다. 또한 amino acid가 baccatin III 생합성을 더욱 증대시킬 수 있는가를 test 하기 위하여 B₅ 배지에 phenyl alanine(0.5 g), tyrosine(0.5 g)를 추가한 배지를 각각 제조하여 비교실험을 하였다.

세포현탁배양 - 덕성여대 교정에 식재된 *Taxus cuspidata*의 어린 싹으로부터 callus를 유도하고, Murashige and Skoog 배지에 5년간의 계대배양을 통하여 baccatin III 생산성이 높은 callus line을 선별하고 B₅ 액체 배지에 현탁 계대배양한 cell을 실험재료로 하였다. 각 실험 조건당 500 ml 삼각 flask 3개 씩에 위에 서술한 바와 같이 제조한 B₅ 액체 배지를 25 ml 씩 분주한 후 각각의 flask에 cell을 2 g 씩 현탁한 후, 진탕배양기에 고정시키고 25°C에서, 회전속도 120 rpm로 진탕하면서 배양하고, 3일 후에 각각의 elicitor 후보물질을 첨가하고, 4주간 진탕 배양하면서, 물질 첨가시점으로부터 2주 후부터 각 조건당 3~4개씩의 flask를 꺼내서 3000 rpm에서 500초 동안 원심분리하여 배지를 제거하고 여과한 후 세포의 무게를 측정하고, 추출재료로 하였다.

Baccatin III의 정량 - 액체배지에서 배양하여 여과한 주목세포를 분쇄하고 methanol 30 ml를 가하고 3분간 sonication 시킨후 여과하고, methanol을 날려보낸 후, 잔사를 증류수에 녹여 dichloromethane으로 2회 추출하여 용매를 제거하고, HPLC용 methanol 5 ml에 녹여 microfliter(5 µm)로 2회 여과하고 Sep-Pak(Silica, Waters)으로 전처리하여 HPLC 정량용 시료로 하였다. Baccatin III의 정량에 사용한 HPLC는 Waters의 Solvent Delivery System 501, 분리에 사용한 column은 µ-bondapak CN(3.9×150 mm), 전계용매는 MeOH : acetonitrile : H₂O(20:31:49), 용매속도 1.0 ml/min 시료의 1회 주입량은 10 µl 였다. Baccatin III 표준품(Sigma, HPLC, 95%)으로 227 nm에서 methanol 용액의 각 농도에 따른 peak area를 측정하여 검량선을 작성하였다. 검량선의 회귀 방정식은 $Y=1.0063x + 7.8994$ 였다.

결과 및 고찰

배양세포의 성장속도는 배양 시작후 2주까지는

각조건 사이의 뚜렷한 차이를 나타내지 않았고, 3주 배양후 비교했을 때 coconut water(Sigma, 50 ml)를 첨가했을 경우, control의 약 1.5배의 cell 증량을 나타내었고, yeast extract의 첨가도 약 1.3배의 세포성장 촉진효과를 가져왔다. 모체식물에서 일반적으로 성장억제 및 노화의 작용이 있는 것으로 알려진 maleic acid hydrazide(Sigma, 0.5 g/500 ml), N-phosphomethyl glycine(0.5 g/500 ml), succinic acid 2.2-dimethyl hydrazide(0.5 g/500 ml) 등도 yeast extract가 공존하는 상태에서는 세포의 성장을 억제하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1).

Baccatin III의 함량에 있어서도 2주 배양후 측정된 결과에서는 각 물질에 의한 현저한 효과가 관찰되지 않았으나, coconut water를 배양세포에 처리하고 배양 3주후 측정했을 때 세포 생중량 1 g당 baccatin III의 함량은 평균 112.2 µg으로 control의 약 10배에 해당되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 결과적으로 coconut water는 세포의 성장과 baccatin III 생합성의 양쪽 측면을 모두 촉진시켰는데, 이러한 결과는 coconut water에는 지방산이 풍부하므로, 그 구성성분의 일부가 jasmonte 등의 일련의 신호전달계 관련물질 생합성 과정에 involve 되었을 가능성을 시사하였다. Coconut water를 구성하는 지방산은 대부분이 포화지방산인 반면, jasmonate는 linolenic acid, arachidonic acid 등의 불포화 지방산으로

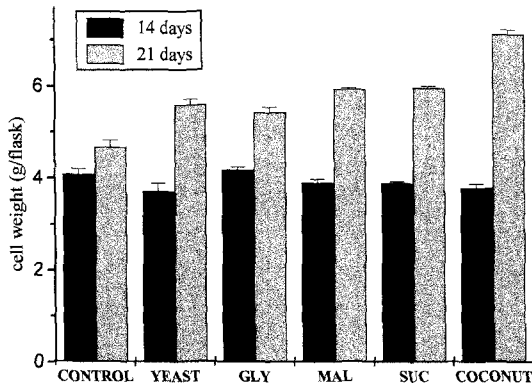


Fig. 1. Weight of cells cultured for 14 and 21 days in B5 medium(25 ml) containing YEAST(yeast extract, 250 mg), GLY(N-phosphomethyl glycine, 250 mg), MAL(maleic acid hydrazide, 250 mg), SUC(succinic acid 2.2-dimethyl hydrazide, 250 mg) and COCONUT(coconut water, 2.5 ml).

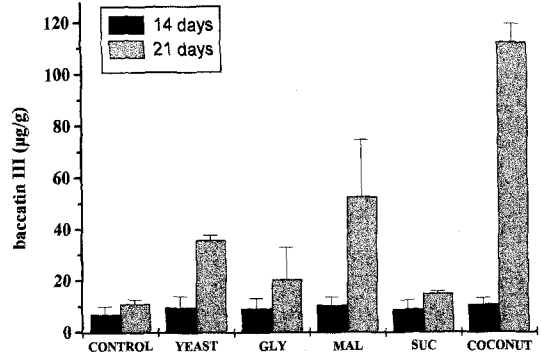


Fig. 2. Effects of elicitors on production of baccatin III in cell suspension culture of *T. cuspidata*.

부터 합성된다는 사실에 비추어 볼 때, 이들 반응사이에 지방산의 고효율적 산화 과정이 관여할 것이 추정된다.

Maleic acid hydrazide, N-phosphomethyl glycine, succinic acid 2.2-dimethyl hydrazide의 처리에 의해서도 baccatin III의 생합성이 증가했는데, 특히 maleic acid hydrazide(0.5 g/500 ml)을 배양액에 첨가했을 때, 3주후 baccatin III 함량이 52.6 µg/g으로 control(10.1 µg/g)의 약 5배인 결과를 보였다.

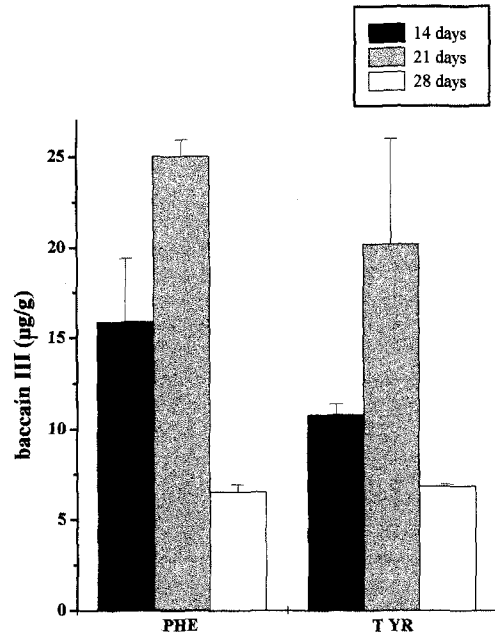


Fig. 3. Time dependent changes of baccatin III in cultured cells after addition of PHE(phenyl alanine, 1 mg/ml) and TYR(tyrosine, 1 mg/ml).

Baccatin III 구조의 benzoyl 기의 origin으로 가능한 amino acid 인 phenyl alanine(0.5 g), tyrosine(0.5 g)의 첨가에 의해서도 baccatin III의 생합성은 증가되는 현상을 나타냈고, 특히 tyrosine 첨가의 경우, 배양시작 3주 후의 측정치가 20.2 µg/g로 control의 약 2배의 생성량을 나타내었다. 4주 배양후 함량이 다시 떨어지는 것은 tyrosine의 독성에 의한 세포대사기능 전반의 저하 때문인 것으로 생각된다(Fig. 3). 그러나 전반적으로 baccatin III의 생합성 증가량이 yeast, coconut water 및 maleic acid hydrazide로 elicitation 시킨 결과에 미치지 못하는 것으로 미루어, baccatin III의 생합성량을 결정하는데 있어서 후반의 benzoylation 과정은 branching point로써의 중요도는 낮은 것으로 생각된다.

결 론

이상의 결과를 종합해 볼 때 baccatin III 등 taxane 유도체의 세포배양에 의한 효율적인 생산에 있어서, 세포막에서 외부자극에 의해서 합성되나, 세포배양계에 외부에서 인위적으로 투여했을 때에도 주목세포에서 taxane 유도체 생합성 촉진을 유발시키는 비수용성이 고가인 신호전달물질 jasmonate을 상대적으로 저가이고, 수용성 내지 물과의 혼화력이 강한 yeast extract나 coconut water로 대체하여 고효율 생산 system을 개발하는 것이 가능할 것으로 보이며, 또한 이 세포배양 system에서 amino acid의 외부공급조절에 의해 taxol 반합성 원료인 baccatin III의 생산 효율을 더욱 높일 수 있는 것으로 나타났다. 또한 본 연구에서는 taxane 유도체 생합성 촉진을 유발시킬 수 있는 것으로 이미 알려진 신호전달물질이며 성장조절제인 jasmonate와 구조적으로 전혀 다른 계열의 성장억제물질인 maleic acid hydrazide, N-phosphomethyl glycine, succinic acid 2,2-dimethyl hydrazide의 처리에 의해서도 baccatin III의 생합성을 촉진시킬수 있다는 것을 확인하였다.

감사의 말씀

본 논문은 덕성여자대학교의 1998년도 연구비 지

원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Muller, M. J., Brodschelm, M., Spannagl, E. and Zenk, M. H. (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the ac-tadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7490-7494.
2. Creelman, R. A and Mullet, J. E (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-382.
3. Bleichert, S., Brodschelm, Holder, S., Kammer, L., Kutchan, T. M. M. Muller, M. J., Xia, Z. Q. and Zenk, M. H. (1995) The octanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4099-4105.
4. Bodnaryk, R. (1994) Potent effect of jasmonate on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard. *Phytochemistry* 35(2): 301-305.
5. Muller, M. J. (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 100: 653-663.
6. Srinivasan, V., Ciddi, V., Bring, V. and Shuler, M. L. (1996) Metabolic inhibitors, elicitors, and precursors as tools for probing yield limitation in taxane production by *Taxus chinensis* cell culture. *Biotechnology Progress* 12(4): 457-465.
7. Mirhalili, N. and Linden, J. C. (1996) Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension culture of *Taxus cuspidata*: Ethylene interaction and induction models. *Biotechnology Progress* 12 (1), 110-118.
8. Yukimune, Y, Tabata, H, Higashi, Y. and Hara, Y. (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus cell* suspension culture. *Nature Biotechnology* 14: 1129-1132.
9. Ciddi, V., Srinivasan, V. and Shuler, M. L. (1995) Elicitation of *Taxus sp.* cell cultures for production of taxol. *Biotechnology Letters* 17 (12): 1343-1346.
10. Jha, S., Sanyal, D., Ghosh, B. and Jha, T. B. (1998) Improved taxol yield in cell suspension culture of *Taxus wallichiana* (Himalayan yew). *Planta Med.* 64(3): 270-272.
11. Strobel, G., Yang, X., Sears, J. Kramer, R.,

- Sidhu, R. S. and Hess, W. M. (1996) Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142 (Pt 2): 435-440.
12. Ellis, D. D., Zeldin, E. L., Brodhagen, M., Rusin, W. A. and McCown, B. H. (1996) Taxol production in nodule cultures of *Taxus*. *J. Nat Prod.* 59(3): 246-250.
13. Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P. and Bignami, G. (1995) The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* 58(9): 1315-24.
14. Zhiri, A., Jaziri, M., Guo, Y., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M., Homes, H., Yoshimatsu, K. and Shimomura, K. (1995) Tissue cultures of *Taxus baccata* as a source of 10-deacetylbaccatin III, a precursor for the hemisynthesis of taxol. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* 376(10): 583-586.
15. Shin, S. W. and Kim, Y. S. (1996) Production of taxane derivatives by cell culture of Korean *Taxus* species (I). *Korean Journal of Pharmacognosy* 27: 262-266.
16. Shin, S. W., Lee L. and Lim. S. (1997) Production of baccatin III by plant cell culture. *Duksung Bull. Pharm. Sci.* 8: 7-11.
17. Fett-Neto, A. G., Melanson, S. J., Nicholson, S. A., Pennington, J. J. and Dicosmo, F. (1994) Improved taxol yeild by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell culture of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering* 44(8): 966-971.
18. Pollard, J. W. (1990) Plant cell and tissue culture. 57-673. Humana Press.

(1998년 10월 7일 접수)