

植物細胞培養에 의한 二次代謝產物 生産技術開發

Development of Secondary Metabolite Production Systems
by Plant Cell Cultures

研 究 機 關

韓國科學技術研究院

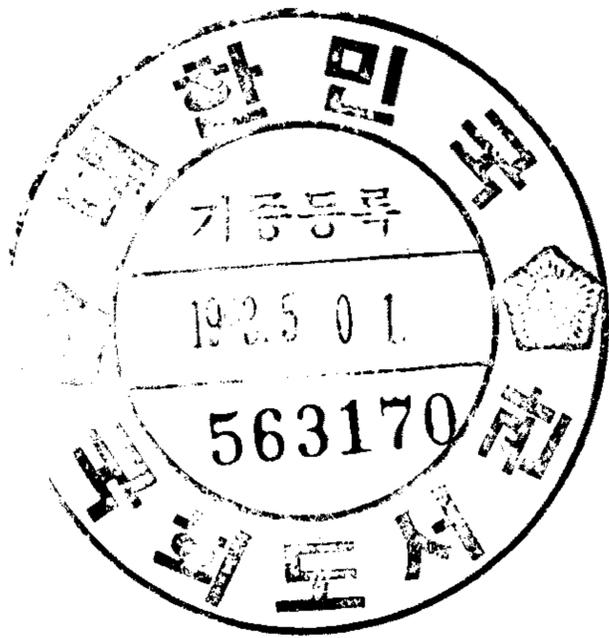
附設遺傳工學研究所

寄贈

科學技術處
寄贈本

一九九三年一月

科 學 技 術 處



제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 " 식물세포배양에 의한 이차대사산물 생산기술 개발 " 과제의 3차년도 최종보고서로 제출합니다.

1992. 6.

주 관 연 구 기 관 : 한국과학기술연구원 유전공학연구소
연 구 책 임 자 : 유장렬 (유전공학연구소 책임연구원)
연 구 원 : 곽상수 (유전공학연구소 선임연구원)
정경희 (유전공학연구소 연구원)
김석원 (유전공학연구소 연구원)
협동연구기관명 : 한국과학기술원 화학공학과
협동연구책임자 : 이 혼 (부 교수)
협동연구기관명 : 한국과학기술원 생명과학과
협동연구책임자 : 유욱준 (교 수)

여 백

요 약 문

I. 제 목

식물세포배양에 의한 이차대사산물 생산기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

협죽도과 식물인 일일초(*Catharanthus roseus*)가 생산하는 ajmalicine, vinblastine, vincristine 등의 indole alkaloid는 혈압강하, 항암작용 등의 약리적 가치가 높은 이차대사산물이다. 특히 이량체 indole alkaloid인 vinblastine과 vincristine은 그램당 미화 5,000불에 상당하는 고가 의약품으로 세계시장규모는 연간 5 - 7.5억불에 달하고 있다. 그러나, 식물체내 이들의 함량은 극미량(수 ppm 정도)이어서 식물체로부터 직접 경제적으로 대량추출하기는 힘이 들고, 또한 이들은 복잡한 화학구조를 하고 있으므로 화학합성적인 방법으로도 대량생산하기가 어렵다. 따라서 새로운 생산법으로 식물조직배양에 의한 일일초의 유용 indole alkaloid 생산에 관한 연구가 많이 시도되어 왔으나 아직 산업화단계까지는 이르지 못하고 있다.

Vinblastine과 vincristine의 생산을 위한 합리적인 방법은 일차적으로 이들의 전구물질인 catharanthine과 vindoline을 각각 대량생산하는 방법을 확립한후 효소학적 또는 화학적반응으로 이량체 indole alkaloid를 생산하는 방법이다. 전구물질중에서 vindoline은 식물체내에 함량이 건물중의 0.12 %로 비교적 높아 분리공정의 최적화로 이를 확보하기 위한 새로운 분리공정법의 개발이 요구된다. 한편 catharanthine의 식물체내의 함량은 0.003 %로 매우 낮으므로 세포배양에 의한 catharanthine 고생산세포주를 선발하여 생산성 향상을 위한 기술 개발 확립으로 이를 생산할 필요가 있다.

따라서, 본 연구과제에서는 이량체 vinblastine의 중요 전구물질인

catharanthine 과 vindoline의 생산체계 확립과 이들로부터 vinblastine을 합성 하기 위하여 다음과 같이 연구를 수행하였다. 첫째, 일일초모상근배양으로부터 catharanthine 고생산세포주를 선발하여 catharanthine의 생산성향상을 위한 배양조건의 적정화에 의한 catharanthine 생산연구, 둘째, 일일초잎으로부터 vindoline를 경제적으로 추출하기 위한 새로운 분리공정법의 개발에 의한 vindoline 생산연구, 셋째, catharanthine과 vindoline의 화학적결합에 의한 vinblastine의 합성연구 및 indole alkaloid 생산성 향상을 위한 분자생물학적 연구등에 각각 주안점을 두고 수행되었다.

III. 1991년도 연구개발의 내용 및 범위

제3차 (최종)년도에서는

1. 일일초모상근배양에 의한 catharanthine 생산기술 개발
2. 일일초잎으로부터 초임계유체추출에 의한 vindoline 추출기술 개발
3. Catharanthine과 vindoline의 화학적 결합에 의한 vinblastine 합성
4. Indole alkaloid 생산성 향상을 위한 분자생물학적 기초연구에 주력하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한

1. 일일초모상근배양에 의한 catharanthine 생산기술 개발

(1) 일일초모상근배양으로부터 catharanthine 고생산세포주를 효율적으로 선발할 수 있었으며 배양조건의 적정화로 catharanthine 생산성을 크게 높일 수 있었다. 특히 모상근의 대량배양으로 catharanthine의 효율적인 생산이 기대된다.

(2) Catharanthine 고생산 모상근 LB1클론을 사용한 배지 적정화연구로 catharanthine의 단위세포당생산성의 최고치는 2.7(mg/g dry wt)이었으며, catharanthine의 최종농도는 28.8(mg/l)였다. 특히 탄소원의 2단계배양(1차 : sucrose, 2차 : fructose)으로 catharanthine의 생산성을 크게 향상시킬 수 있었다(71 mg/L). 모상근 LB1을 air-lift식 생물배양기로 대량배양이 가능하였다.

2. 일일초잎으로부터 초임계유체추출에 의한 vindoline 추출기술 개발

(1) 일일초잎으로부터 고압고밀도 상태의 이산화탄소를 사용한 초임계유체 추출에 의해 vindoline을 효과적으로 추출하는 분리 공정법을 확립하였다. 추출물중의 alkaloid는 HPLC 와 LC-MS 로 각각 정량, 정성분석되었다.

(2) 초임계유체추출에 의해 추출된 vindoline의 양은 35 °C, 300 bar에서 식물 체중의 58%로 가장 많았으며, 추출물중의 vindoline의 선택성은 35 °C, 100 bar에서 약 63 %로 가장 높았다. 보조용매로 에탄올 3% 을 첨가하여 사용하였을 경우 vindoline의 수율과 선택성은 초임계상태의 이산화탄소만을 사용하였을 때보다 약간 증가하였다.

3. Catharanthine과 vindoline의 화학적 결합에 의한 vinblastine 합성

(1) LB1 모상근 클론으로부터 분리한 catharanthine 과 식물체 잎으로부터 초임계유체추출로 분리한 vindoline을 3가철 존재에서 화학적결합으로 vinblastine 과 3',4'-anhydrovinblastine을 효율적으로 합성할 수 있었다.

(2) Catharanthine과 vindoline을각각 일정량 (0.5 mg) 포함한 0.1 M glycine buffer (pH 2.0)에 FeCl₃ (최종농도 40 mM)을 첨가하여 4 °C에서 2시간반응시킨 후, 반응물을 NaBH₄로 환원시킨후생성물을 추출하여 HPLC로 분

석한 결과, vinblastine과 3,4-anhydrovinblastine이 주 생성물이었다. 두 물질의 수율은 각각 약 30%로 HPLC로 정량되었다.

4. Indole alkaloid 생산성 향상을 위한 분자생물학적 기초연구

(1) Catharanthine 고생산 세포주 VPC-10을 사용하여 계대배양 후 9일째 세포에서 분리한 mRNA로부터 cDNA library를 만든 후, 약 만개의 plaque를 중심으로 differential screening을 수행한 결과, 5일째 배양한 세포에서는 발현이 미약하나 9일째 세포에서 강하게 발현되는 plaque 3개를 분리하였다.

(2) 일일초의 약유래 캘러스로부터 체세포 배발생 경로를 통하여 처음으로 식물체 재분화를 유기할 수 있었다. 재분화 식물체는 정상 diploid chromosome 수($2n=4x=16$)을 나타내었다. 일일초의 재분화기술은 indole alkaloid 생산성 향상을 위한 분자유종에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Summary

I. Title

Development of Secondary Metabolite Production Systems by Plant Cell Cultures.

II. Objectives and Needs of the Project

Vinca (Catharanthus roseus) produces the commercially important indole alkaloids such as vinblastine and vincristine. These dimeric indole alkaloids are used for the treatment of leukemia and malignant lymphoma. Because they are present at extremely low concentrations in the plant, the cost to extract them from cultivated plants is high. Furthermore, their complicated chemical structures discourage chemical synthesis on a commercial scale. Therefore, many researchers have tried to develop methods to produce the compounds by plant cell cultures. However, there has been no reports on efficient production methods of dimeric indole alkaloids by cell cultures in respect to economic consideration. Vinblastine and vincristine are produced by coupling two different monomeric indole alkaloids, vindoline and catharanthine. The former is accumulated at a relatively high level in the plant, whereas the latter could be produced at a considerable level by plant tissue culture. Thus, it has been considered rational to produce the dimers by coupling catharanthine obtained from cell cultures with vindoline obtained from cultivated plants.

In this context, we have aimed at 1) establishing the production systems of catharanthine by hairy root cultures, 2) establishing the efficient extraction method of vindoline from vinca leaves using supercritical carbon dioxide, 3) producing the vinblastine by chemically coupling catharanthine and vindoline, and 4) studying on molecular approaches to improve the productivity of indole alkaloids.

III. Content and Scope of the Project

In the third year (1991), the project has aimed at the followings :

1. Production of catharanthine by hairy root cultures.
2. Extraction of vindoline from vinca leaves by supercritical carbon dioxide.
3. Production of vinblastine by chemically coupling of catharanthine and vindoline.
4. Molecular biological approaches for improving the indole alkaloid productivity

1. Production of catharanthine by hairy root cultures.

1) The cell lines for high yields of catharanthine were efficiently selected from hairy roots cultures of vinca (*Catharanthus roseus*). The productivity of catharanthine was increased by optimization of culture conditions. The efficient production systems of catharanthine are expected by mass cultures of hairy roots using bioreactors.

2) In cultures of LB1 hairy root clone, the optimized medium increased the maximum yield and the final concentration of catharanthine up to 2.7 (mg/g dry wt) and 28.75 (mg/l), respectively. The two stage culture using sucrose (1st) and fructose (2nd) increased the biomass up to 20 g dry wt/l and improved volumetric yields of catharanthine about two-fold, i.e. 73 mg/l, than the one stage culture using sucrose. The mass production of hairy roots was conducted by air-lift bioreactor.

2. Extraction of vindoline from vinca leaves by supercritical carbon dioxide.

1) Indole alkaloids, particularly vindoline was effectively extracted from the leaves of vinca (*C. roseus*) by supercritical fluid extraction(SFE) method using the nontoxic carbon dioxide as the supercritical solvent. The quantitative and qualitative analysis of indole alkaloids in the extracts were carried out by HPLC and LC/MS, respectively.

2) The highest extraction yield of vindoline in the extract was 58 % of intact leaf at 35 °C and 300 bar, whereas the highest vindoline selectivity (63%) was obtained at 35 °C and at 100 bar. The use of 3 % ethanol in carbon dioxide only slightly improved the extraction yields or selectivities at some experimental conditions.

3. Production of vinblastine by chemically coupling of catharanthine and vindoline.

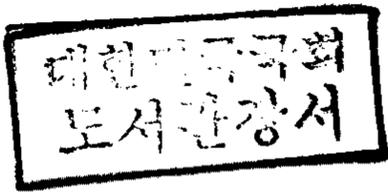
1) The production of vinblastine and 3',4'-anhydrovinblastine were efficiently done by chemical coupling vindoline from cultivated plants by SFE and catharanthine from hairy root cultures in the presence of ferric ion.

2) The reaction mixture consisted of vindoline (0.5 mg), catharanthine (0.5 mg), and ferric chloride (40 mM) in 6 ml glycine buffer (100 mM, pH 2.0 at 4 °C). After shaking at 4 °C for 2hr, the reaction was stopped by addition of a molar excess amount of sodium borohydride and 1.0 ml of 14 M aqueous ammonium hydroxide. The vinblastine and 3',4'-anhydrovinblastine were predominant products. The yields of each product were approximately 30 % by HPLC analysis.

4. Molecular biological approaches for improving the indole alkaloid productivity.

1) After cDNA library was constructed from mRNA of cells of VPC-10 (9 days), the three plaques showing strong expressions were selected by the differential screening method comparing with those of 5 days.

3) Plant regeneration of vinca (*C. roseus*) was obtained for the first time from anther-derived callus through somatic embryogenesis. The regenerants showed the normal diploid chromosome number of $2n = 4x = 16$. Thus it remains to be determined whether they originated from somatic cells or from pollens per se via endomitosis.



Contents

Chapter I. Production of catharanthine by hairy roots cultures.-----	15
Chapter II. Extraction of vindoline from vinca leaves by supercritical carbon dioxide.-----	29
Chapter III. Production of vinblastine by chemical coupling of catharanthine and vindoline.-----	37
Chapter IV. Molecular biological approaches for improving the indole alkaloid productivity.-----	45
1. cDNA cloning in relation to indole alkaloid biosynthesis.-----	45
2. Plant regeneration of from anther-derived callus through somatic embryogenesis in vinca.-----	57
Chapter V. Appendix (Patent and publication lists related to the project).-----	67

여 백

목 차

제 1 장 일일초모상근배양에 의한 catharanthine 생산기술 개발-----	15
제 2 장 일일초잎으로부터 초임계유체추출에 의한 vindoline 추출 기술 개발-----	29
제 3 장 Catharanthine과 vindoline의 화학적 결합에 의한 vinblastine 합성-----	37
제 4 장 Indole alkaloid 생산성 향상을 위한 분자생물학적 기초연구-----	45
제 1 절 Indole alkaloid 생합성관련 유전자들의 cDNA 합성-----	45
제 2 절 일일초약유래 캘러스로부터 식물체 재분화-----	57
제 5 장 부록 (본과제와 관련한 특허 및 국내외 학술지 게재논문 목록)-----	67

여 백

제 1장 일일초모상근배양에 의한 catharanthine 생산기술 개발

제 1절 서론

*Agrobacterium rhizogenes*에 의해 유도되는 hairy root는 모식물의 뿌리에서 생산되는 이차대사산물을 생산할 수 있으며, 유전적으로나 생화학적으로 안정한 것으로 알려져있다(Hamill et al., 1987). 또한, hairy root는 식물체 뿌리의 성장속도보다 빠르기 때문에 유용물질의 생산성이 높고 안정한 clone의 선발이 가능하다.

본 연구에서는 vinblastine의 전구체인 catharanthine을 생산하는 hairy root를 선발한 후, 이를 이용하여 catharanthine의 생산성 증가를 위한 배지 최적화 실험과 생산공정 개발을 수행하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. Hairy root의 유도

무균발아된 일일초(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don ; cv. Little Bright Eye)의 하배축 부위에 *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834를 접종한 후 이를 SH (Shenk and Hildebrandte, 1972) 기본배지에 배양하였다. 감염부위에서 생성된 hairy root를 잘라내어 0.5 g carbenicillin/l 이 첨가된 1/3 SH 기본배지(1/3 SHBM)로 옮겨 배양하였다. Carbenicillin이 들어있는 배지에서 2-3회 계대배양하여 bacteria의 오염을 제거한 후, 1/3 SHBM 액체배지에 접종하여 배양하였다.

2. Hairy root의 배양 조건

Hairy root의 계대배양은 3주간격으로 하였으며, 생중량 0.25 g의 hairy root를 1/3 SHBM 배지 30mL(100 mL Erlenmyer flask)에 혹은 생중량 0.5 g을 1/3 SHBM 배지 60mL(300 mL Erlenmyer flask)에 접종하였다. 무기염 성분의 영향에 관한 실험에서는 기준배지로서 1/3 SHBM을 사용하고 각 무기염농도를 달리하여 hairy root을 배양하였다. 탄소원의 영향을 살펴본 실험에서는 탄소원을 membrane filter에 의해 멸균 후 첨가하였다. 모든 실험은 25°C, 암상태에서 수행되었으며, 100 rpm의 gyratory shaker에 진탕배양하였다.

3. Indole alkaloid의 정량 및 정성분석

배양된 hairy root는 수거하여 증류수로 세척한 후, 50 °C에서 24시간 동안 건조하여 건중량을 측정하였다. 건조된 hairy root 50mg에 methanol 10 ml를 첨가하여 50°C 수조에서 sonication을 3회 반복하여 얻어진 methanol 추출액을 감압농축하였다. 농축액을 보고된 방법(Jung et. al., 1992a)에 따라 정제하여 alkaloid extract를 얻었다. Alkaloid는 ODS(μ -Bondapack C₁₈, 300 x 3.9 mm) 컬럼을 사용한 HPLC로 정량분석하였다. Alkaloid들 중에서 catharanthine과 ajmalicine은 authentic compound와 비교하여 정량하였다. 용출액 (methanol : acetonitrile : 5 mM diammonium hydrogen phosphate, pH 7.3, 3:4:3)의 유속은 1 ml/min였으며, UV 298 nm에서 각화합물을 검출하였다. Ajmalicine과 catharanthine의 정성분석은 mass spectrometer (Hewlett-Packard 5989A)에 의해 수행하였다. 이때 사용된 방법은 electrone impact 법으로서 ion source는 70 eV였고 온도는 150 °C 였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Catharanthine 생산 hairy root의 선발

일일초(*C. roseus*) 하배축의 *A. rhizogenes* 감염부위에서 생성된 hairy root를 잘라내어 0.5 g carbenicillin/l가 첨가된 1/3 SH 기본배지(1/3 SHBM)로 옮겨 배양하였다. Carbenicillin이 들어있는 배지에서 2-3회 계대배양하여 bacteria의 오염을 제거한 후, 1/3 SHBM 액체배지에 접종하여 배양하였다. 이와 같은 과정을 Figure 1에 나타냈다.

유도된 hairy root들 중에서 catharanthine을 고농도로 생산하는 clone LB1을 선발하였으며, 이로부터 생산된 indole alkaloid들 중에서 HPLC에 의해 분취된 ajmalicine과 catharanthine의 mass spectrum을 분석한 결과 authentic compound와 일치하였다(Figure 2).

2. 배지의 무기염 성분이 catharanthine 생산에 미치는 영향

2.1. 전체 무기염농도의 영향

SH 배지의 전체 무기염의 농도를 1, 1/2, 1/3, 1/4로 희석하여 hairy root를 배양하였을 때, 무기염농도가 hairy root의 성장 및 catharanthine 생산에 미치는 영향을 Figure 3에 나타내었다. Catharanthine의 단위세포당생산성(Y_p/x , mg/g dry wt)은 무기염의 농도가 낮아짐에 따라 증가하여 1/3 SH에서 최대 (1.8 mg/g dry wt) 였다.

2.2. Nitrate의 catharanthine 생산에 미치는 영향

Nitrate(NO_3)는 질소원으로 hairy root의 성장과 catharanthine의 단위세포당생산성을 동시에 증가시켰다. 초기 nitrate의 농도를 높임에 따라 hairy root의 생장이 증가하였으며, 또한 catharanthine의 단위세포당생산

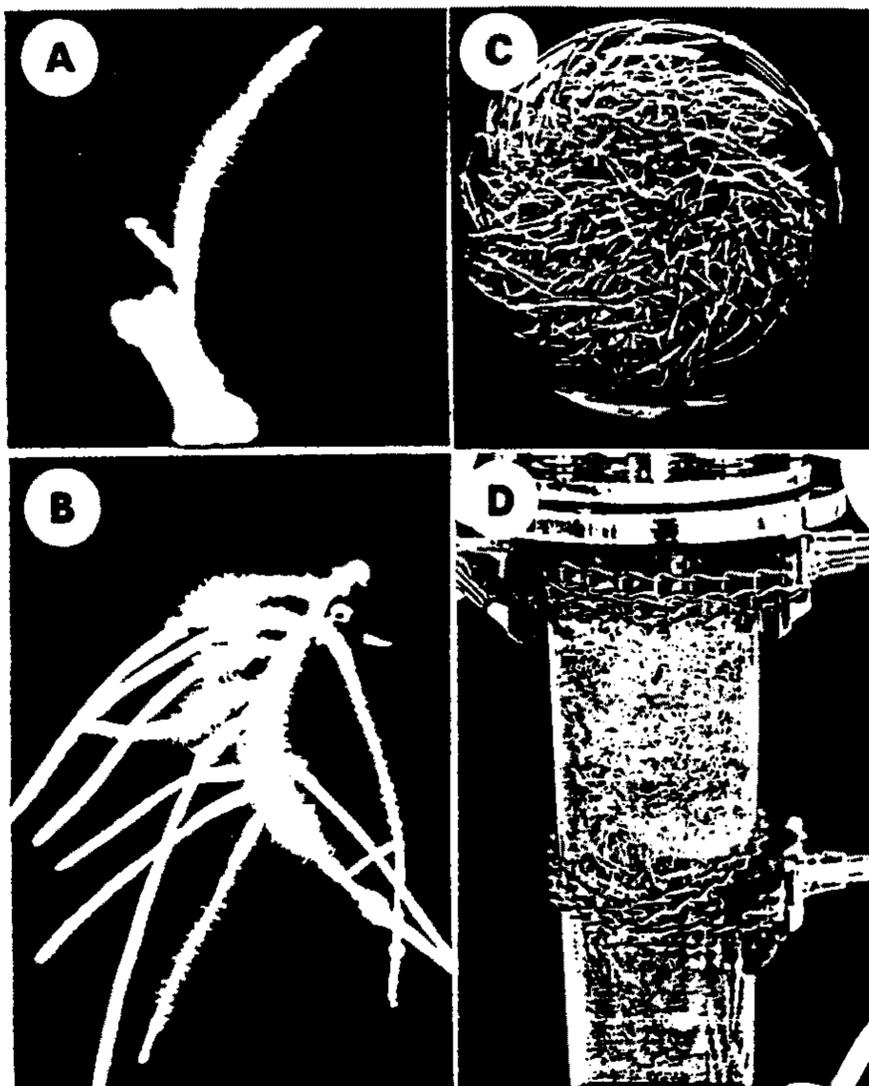


Figure 1. Establishment of *C. roseus* hairy root culture.
A : Formation of hairy root on hypocotyl segment.
B : Proliferation of hairy root from one root tip.
C : Hairy root cultured in an Erlenmyer flask.
D : Hairy root cultured in air-lift reactor.

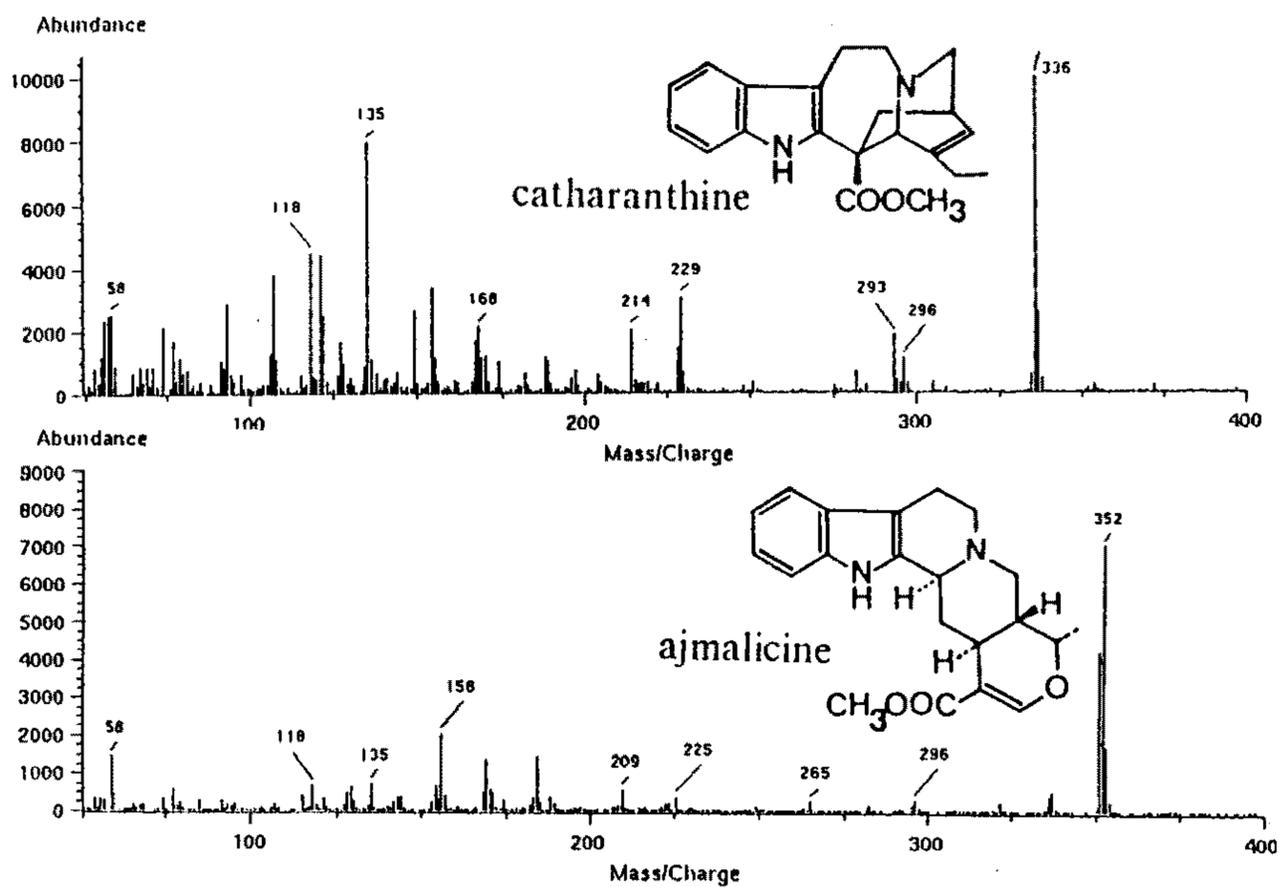


Figure 2. Mass spectrum of ajmalicine and catharanthine produced in LB1 hairy root cultures.

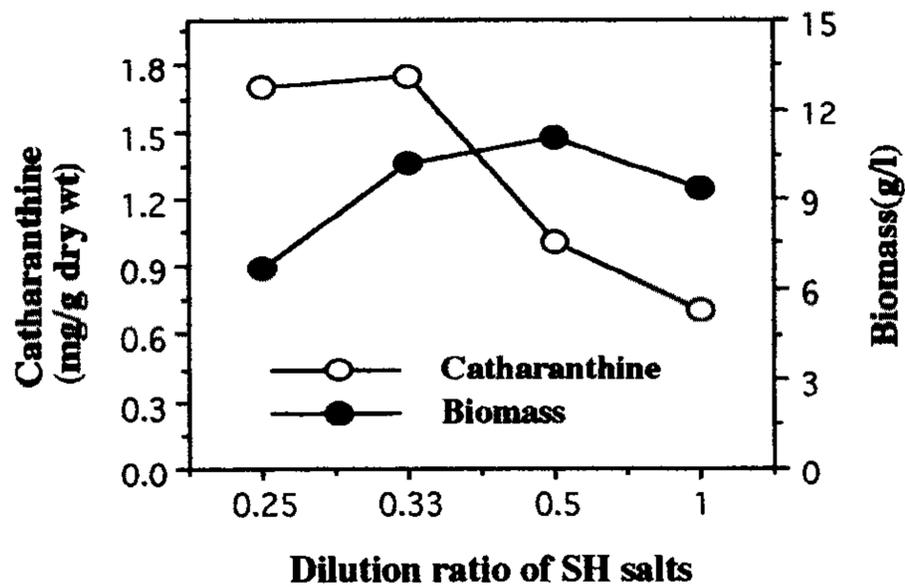


Figure 3. Effects of dilution ratio of SH basal salts on the growth and catharanthine production of LB1 hairy root cultures. The concentrations of basal salts of media were serially diluted. Hairy roots were harvested after 3 weeks.

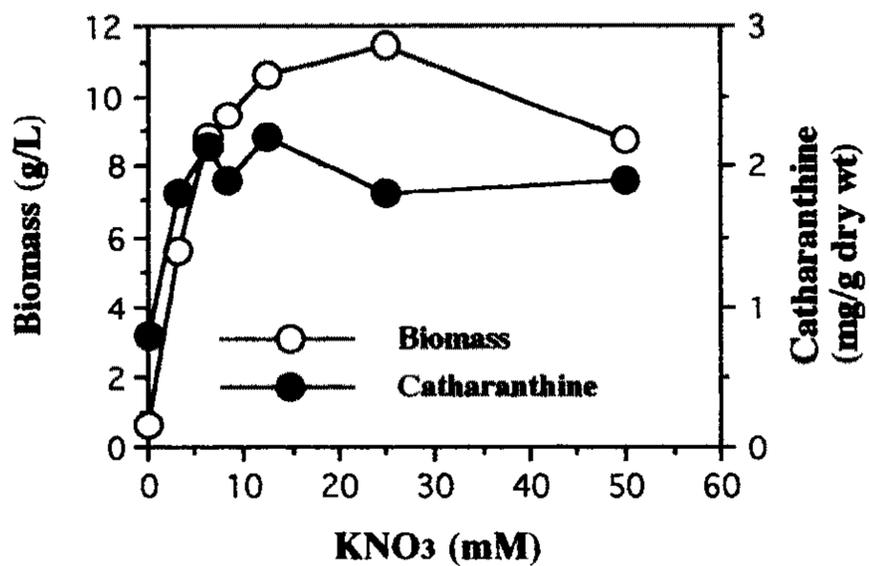


Figure 4. Effect of initial concentration of nitrate on the growth and catharanthine production of LB1 hairy root cultures. Hairy roots were harvested after 3 weeks.

성도 증가하였다. Hairy root의 생장에 있어서는 nitrate의 농도가 25 mM에서 최대였으며, catharanthine의 단위세포당생산성은 nitrate의 농도가 8 mM 이상에서도 더 이상 증가하지 않았다(Figure 4). Hairy root의 생장과 catharanthine의 생산성을 동시에 고려한 단위부피당 생산성은 nitrate의 초기 농도가 13 mM에서 최대였다.

2.3. Ca, KI, Co 등의 catharanthine 생산에 미치는 영향

Ca, KI, Co 등의 catharanthine 생산에 미치는 영향을 각각 조사하였다. CaCl₂의 농도가 높아지면 hairy root의 생장이 억제되었으나 catharanthine의 단위세포당 생산성은 증가하였다. Catharanthine의 단위세포당 생산성은 CaCl₂의 초기농도가 1.5 mM에서 최대였다. CoCl₂의 경우 농도가 증가하면 hairy root의 생장에 저해작용을 하였으나, CoCl₂의 초기농도가 2 μM일 때 단위세포당 생산성이 최대였다. KI는 hairy root의 생장은 촉진하였으나 catharanthine의 단위세포당생산성에는 별다른 영향을 주지않았다. Hairy root의 생장과 catharanthine의 단위세포당생산성을 고려한 단위부피당생산성은 CaCl₂, KI, CoCl₂의 초기 농도가 각각 1.5 mM, 12 μM, 0.8 μM일 때 최대였다.

2.4. Ammonium의 catharanthine 생산에 미치는 영향

NH₄⁺의 농도를 5.2 mM까지 증가시킬 경우 hairy root의 생장은 지속적으로 증가하였다. 그러나 hairy root의 생장과는 반대로 초기 NH₄⁺의 농도가 높으면 catharanthine의 단위세포당생산성이 감소하였다. Hairy root의 생장과 catharanthine의 생산성을 고려한 단위부피당생산성은 NH₄⁺의 초기농도가 1.3 mM일 때 최대였다(Figure 5).

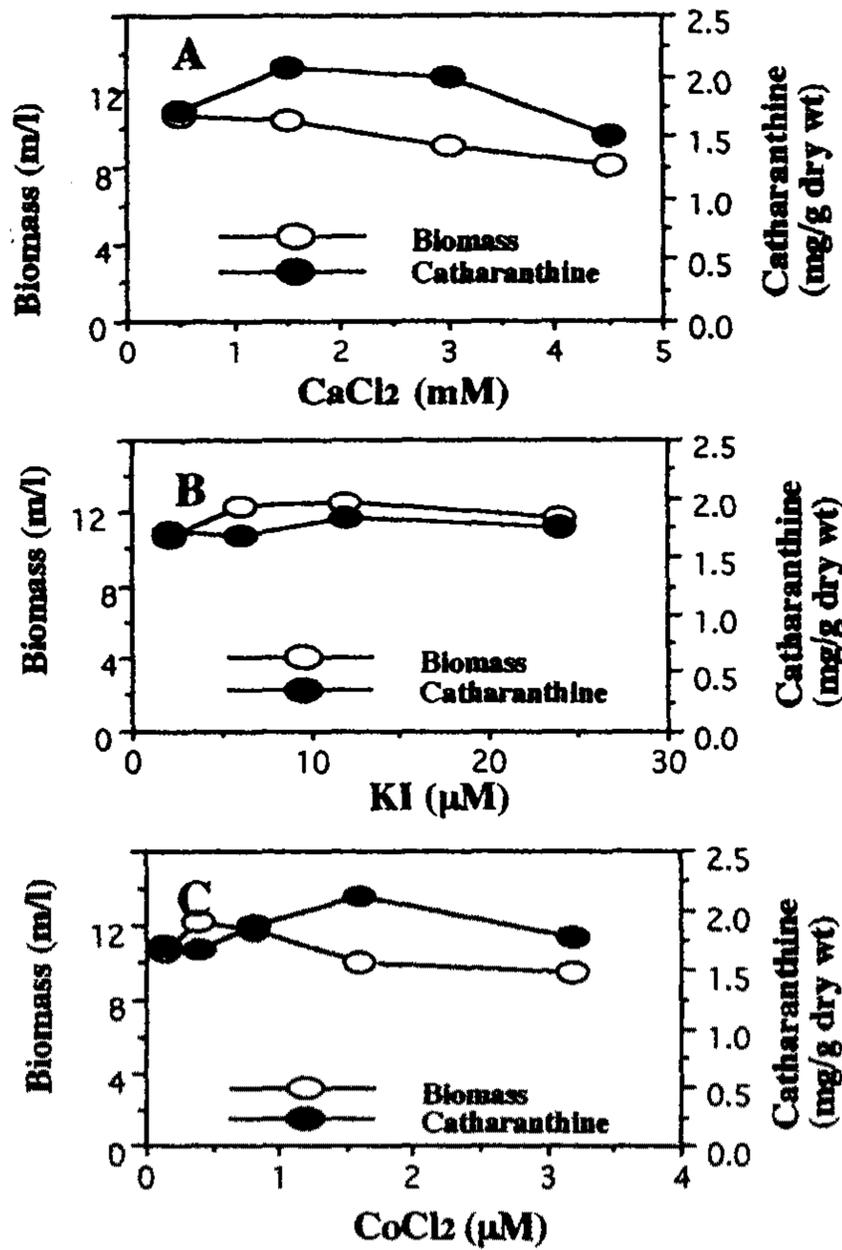


Figure 5. Effects of CaCl₂, KI, and CoCl₂ on the growth and catharanthine production of LB1 hairy root cultures. The initial concentrations of each ions were represented in X axis. Hairy roots were harvested after 3 weeks.

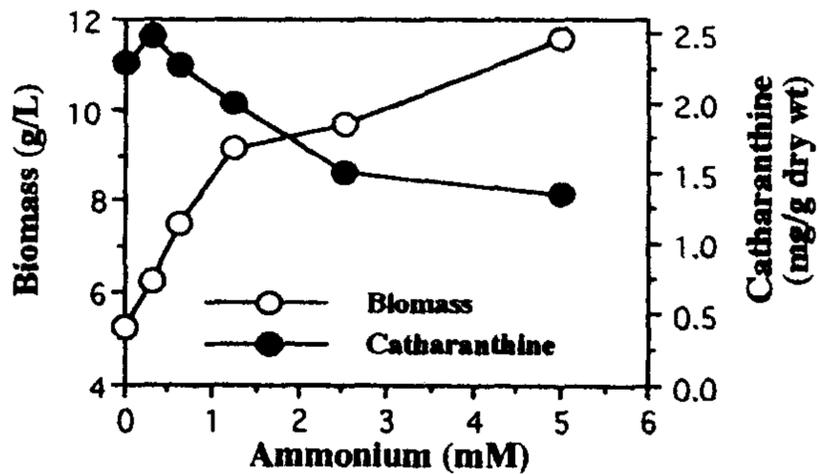


Figure 6. Effect of initial concentration of ammonium on the growth and catharanthine production of LB1 hairy root cultures. Hairy roots were harvested after 3 weeks.

2.5. Phosphate의 catharanthine 생산에 미치는 영향

Phosphate의 경우도 NH_4^+ 와 비슷한 경향을 보였다. Phosphate의 농도가 2.6 mM까지는 농도에 비례하여 hairy root의 생장은 증가하였으나, 그 보다 높은 농도에서는 hairy root의 생장이 저해받았다. Catharanthine의 단위세포당생산성은 phosphate 농도가 높아지면 급격하게 감소하였다. Phosphate가 제거된 배지에서 catharanthine의 단위세포당생산성은 3.5(mg/g dry wt)까지 증가하였다(Figure 6). Catharanthine의 단위부피당 생산성은 phosphate의 농도가 0.6 mM에서 최대였다.

2.6. 무기염농도 최적화배지에서의 catharanthine 생산

이상의 실험에서 단위부피당생산성이 최대였을 때의 각 성분 농도를 택하여 새로운 배지(MSH)를 만들었다. MSH 배지와 기존의 1/3 SH 배지에 의 hairy root의 성장과 catharanthine 단위부피당생산성의 변화를 Figure 7에 나타냈다. MSH 배지에서의 hairy root의 성장속도는 1/3 SH 배지에서 보다 조금 빨랐으며 최종세포농도 또한 약간 높았다. MSH 배지에서의 catharanthine의 단위세포당생산성의 최고치는 2.7(mg/g dry wt)로서 1/3 SH 배지에서의 최고치(2.1) 보다 30% 가량 증가하였다. MSH 배지에서 catharanthine의 최종농도는 28.75 mg/l로서 1/3 SH 배지에서의 최종농도(18.7) 보다 50% 증가하였다.

3. 탄소원의 catharanthine 생산에 미치는 영향

3.1. Monosaccharides의 catharanthine 생산에 미치는 영향

탄소원인 sucrose를 fructose나 glucose로 대체하였을 때 hairy root의 성장 및 catharanthine의 생산에 대한 영향을 Figure 8에 나타냈다. Glucose나 fructose가 들어있는 배지(G or F 배지)에서 hairy root의 생장은 sucrose가

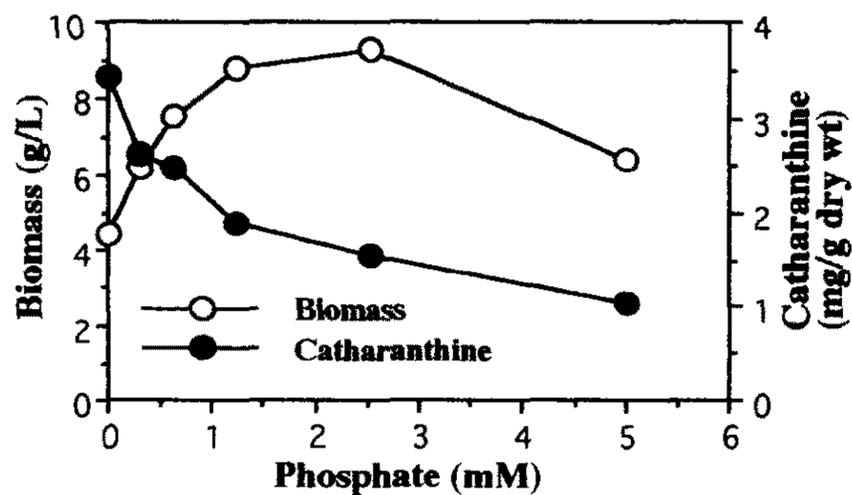


Figure 7. Effect of initial concentration of phosphate on the growth and catharanthine production of LB1 hairy root cultures. Hairy roots were harvested after 3 weeks.

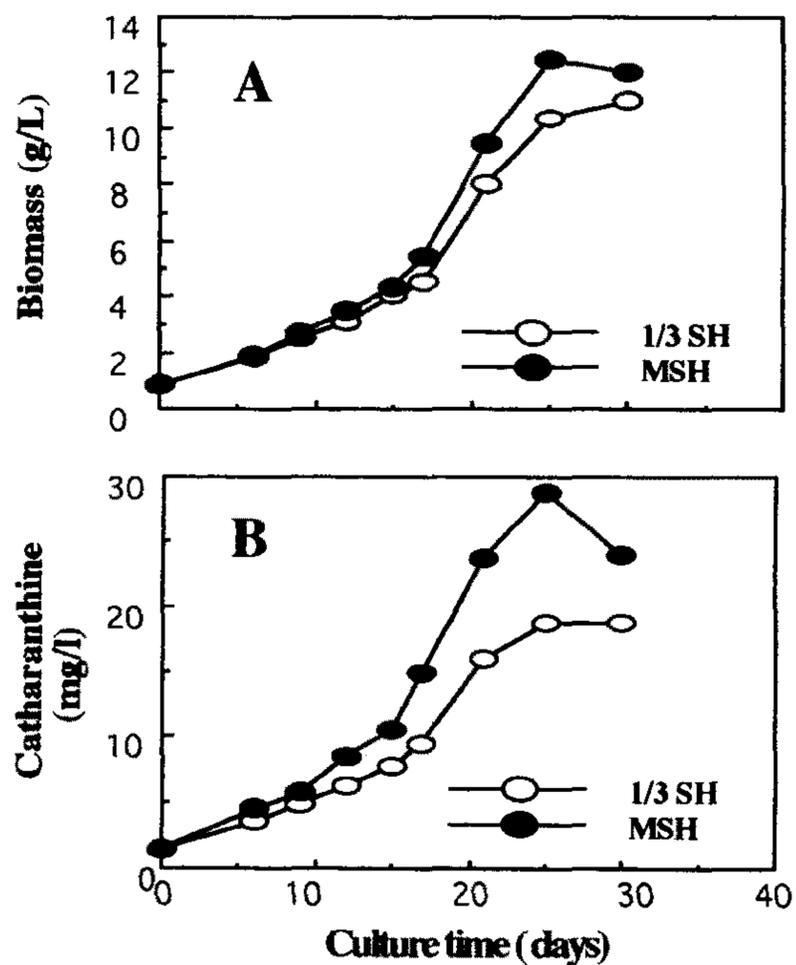


Figure 8. Comparison of the growth and catharanthine production between modified medium (MSH) and original medium (1/3 SH).

A : profile of hairy root growth

B : profile of catharanthine production

들어있는 배지(S 배지)에서 보다 초기의 lag phase가 길어지며 hairy root의 성장속도가 낮아졌다(Figure 8-A). Hairy root의 생장은 늦어지지만 sucrose를 사용하였을 때보다 catharanthine의 단위세포당생산성이 2 배 (3.5 mg/g dry wt)까지 지속적으로 증가하였다 (Figure 8-B).

3.2. S배지에서 F배지로의 2 단계 배양에 의한 catharanthine 생산성 향상

Fructose를 탄소원으로 사용하였을 때 catharanthine의 단위세포당생산성은 sucrose를 탄소원으로 했을 때 보다 증가했지만 hairy root의 최종농도는 낮았다. 단위부피당생산성을 향상시키기위해 2 단계배양을 도입하였다. Sucrose에서 배양도중(배양 15 일 후)에 fructose가 들어 있는 배지로 옮겼을 때의 hairy root의 성장과 catharanthine의 생산을 Figure 10에 나타냈다. Hairy root의 성장에는 큰 차이가 없었으나 (Figure 9-A), catharanthine의 단위세포당생산성 증가로 인하여 catharanthine의 최종농도가 41 mg/l로서 sucrose에 배양한 경우(22 mg/l) 보다 2 배의 향상을 보였다(Jung *et. al.*, 1992b).

3.3. S 배지에서 MF 배지로의 2 단계배양

무기염 농도의 최적화에 의해 새로이 조성된 배지(MSH)의 탄소원인 sucrose를 fructose로 대체한 배지(MF 배지)를 2 단계배양에 적용하였다. 1 차로 앞의 실험과 마찬가지로 S 배지에서 배양하고 2 차배양을 MF 배지에서 수행한 결과를 Figure 11에 나타내었다. Sucrose에서 배양도중(배양 18 일 후)에 fructose와 sucrose가 들어있는 배지로 옮겼을 때의 hairy root의 생장은 fructose가 들어있는 배지에서 더 높은 농도까지 증가하였다(Figure 10-A). Catharanthine의 단위세포당생산성이 3.69(mg/g dry wt)까지 증가(Figure 11-B) 하였으며 35 일간 배양한 결과 최종 hairy root의 농도가 20 g/l였다. Catharanthine의 최종 단위부피당농도는 73.8 mg/l 였다.

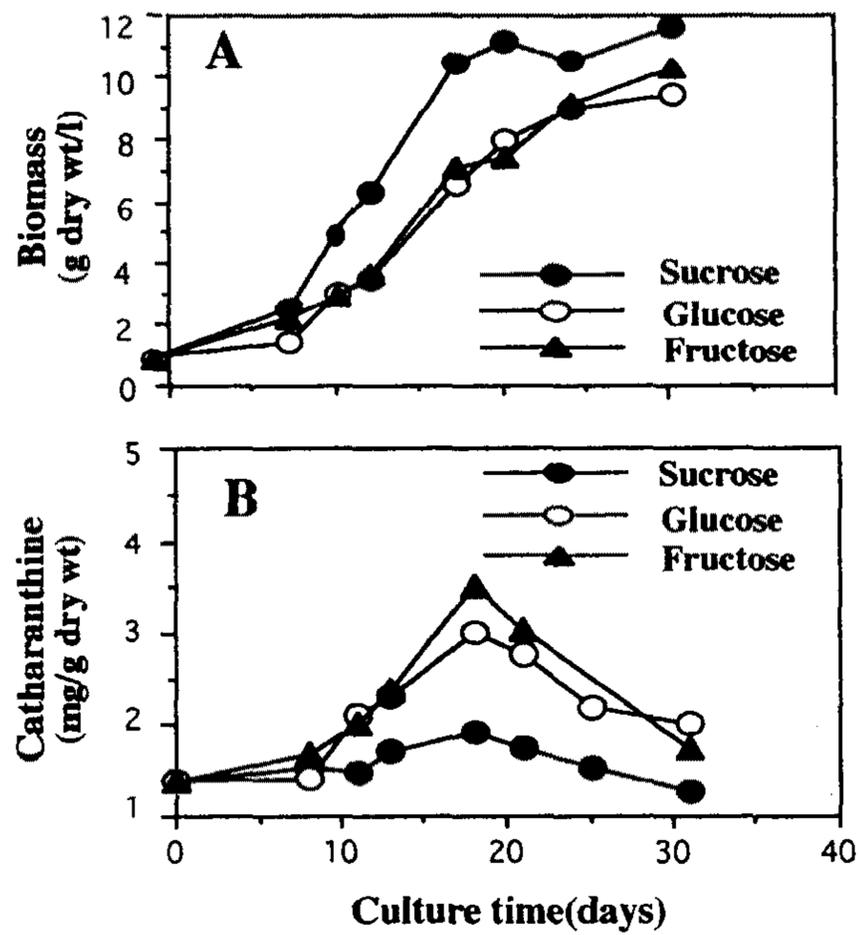


Figure 9. Growth and catharanthine accumulation of *C. roseus* hairy root cultures using different sugars. Hairy roots were cultured in medium containing either sucrose, glucose or fructose at 30 g/l.
A : profile of hairy root growth
B : profile of catharanthine yield in hairy root.

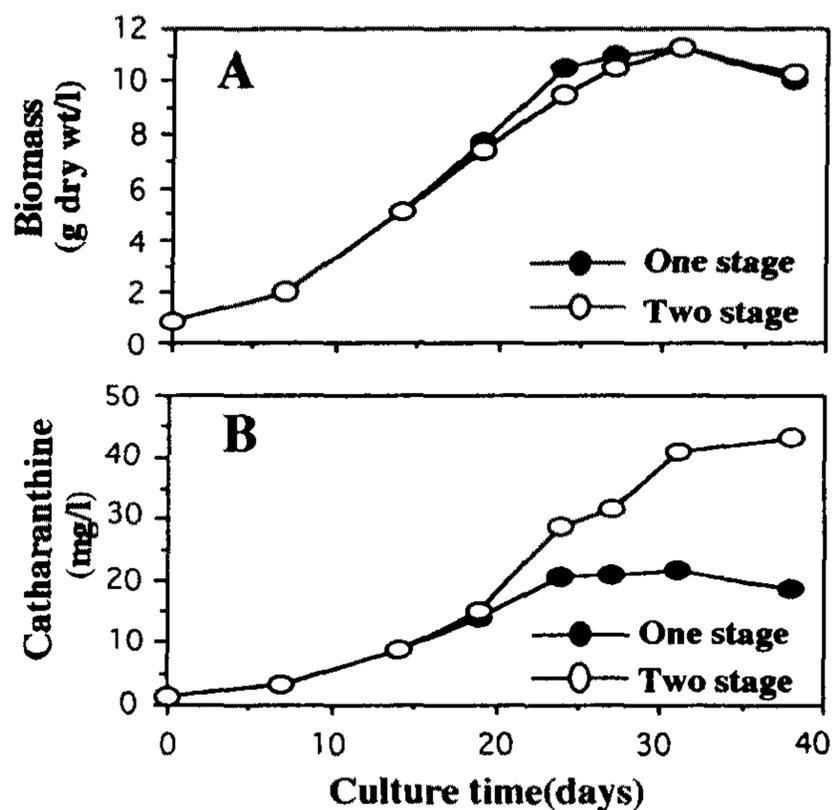


Figure 10. Comparison of the growth and catharanthine production between one stage and two stage culture of *C. roseus* hairy root. Arrows indicate the time of medium change from medium containing sucrose to fructose at 30 g/l.
A : profile of hairy root growth
B : profile of catharanthine production.

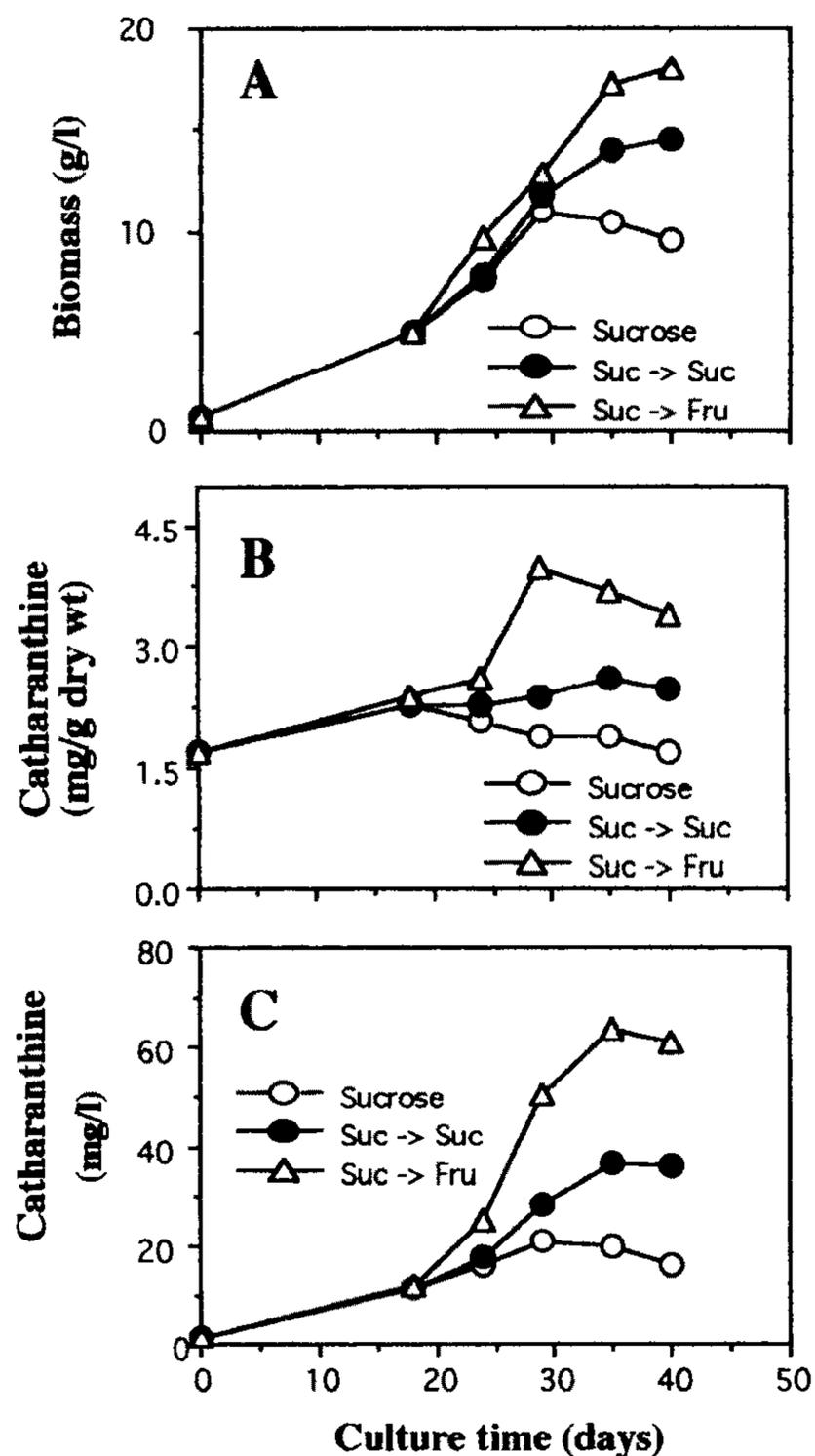


Figure 11. Comparison of the growth and catharanthine production between one stage and two stage culture of *C. roseus* hairy root. Arrows indicate the time of medium change from medium containing sucrose to sucrose or fructose at 30 g/l. A : profile of hairy root growth, B : profile of catharanthine yield, C : profile of total catharanthine.

- : one stage culture in S medium
- : two stage culture from S medium to S medium
- △ : two stage culture from S medium to MF medium

제 4 절 결 론

일일초(*C. roseus*)로 부터 유도된 hairy root들 중에서 catharanthine을 고농도로 생산하는 clone LB1을 선발하였으며, 이로부터 생산된 indole alkaloid들 중에서 ajmalicine과 catharanthine을 mass spectrum에 의해 분석한 결과 authentic compound와 일치함을 확인하였다.

선발된 hairy root를 사용하여 배지의 최적화와 2 단계배양 공정을 개발한 과정을 Table 1에 정리하였다. SH 배지의 무기염 성분의 최적화에 의해 catharanthine의 단위세포당생산성을 2.7(mg/g dry wt)까지 증가시켰다. 탄소원인 sucrose를 fructose나 glucose로 대체하였을 때 catharanthine의 단위세포당생산성이 2 배(3.5 mg/g dry wt)까지 지속적으로 증가하였다. 이와 같이 무기염농도의 최적화와 탄소원의 대체를 동시에 적용한 2 단계배양에서, 최종 hairy root의 농도를 20 g/l로 catharanthine의 최종농도를 73.8 mg/l 까지 증가시킬 수 있었다.

Table 1. Enhanced production of catharanthine in LB1 hairy root cultures by optimization of culture conditions.

Culture condition	Biomass (g/l)	Catharanthine yield(mg/d dry wt)	Culture time(days)	Volumetric yield(mg/l)
one stage				
1/3 SH (S)	11.8	1.75	21	21.8
MSH (S)	12.5	2.3	25	28.75
1/3 SH (F)	7.0	3.5	21	24.55
two stage				
1/3 SH (S->F)	11.3	3.63	31	41.0
1/3 SH (S) -> MSH (F)	20	3.69	35	73.8

1/3 SH : medium containing one-third diluted basal salts of SH, **MSH** : modified medium formulated in this study. S or F in parenthesis means sucrose or fructose used as a carbon source in each media, respectively.

제 5 절 참고문헌

- K.H. Jung, S.S. Kwak, S.W. Kim, C.Y. Choi, G.S. Heo and J.R. Liu (1992a)
Selection of protoclonal lines for high yields of indole alkaloids from suspension cultures of *Catharanthus roseus* and the qualitative analysis of the compounds by LC-MS. *Biotechnology Techniques*. 6 (4) : 305-308.
- K.H. Jung, S.S. Kwak, S.W. Kim, H. Lee, C.Y. Choi, and J.R. Liu (1992b)
Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source.
Biotechnology Letters. (in press)
- Hamill, J.D., Parr, A.J., Rhodes, M.J.C., Robins, R.J., and Walton, N.J. (1987) New routes to plant secondary metabolites. *Bio/Technology*, . 5, 800-804.
- Shenk, R. and Hildebrandt, A. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous cell cultures. *Can J. bot.*, 50:100-204.

제 2 장 일일초잎으로부터 초임계유체추출에 의한 vindoline 추출기술 개발

제 1 절 서 론

의약품, 식품, 향신료 등에 포함된 대부분의 유효성분들은 화학적 방법으로 생산하기에는 현재 불가능하거나 매우 어렵기 때문에 천연 식물로부터 추출하여 사용하는 경우가 많다. 백혈병(Leukemia)과 악성림파육아종양(Hodgkin's disease)의 치료제로 널리 쓰이고 있는 vinblastine과 vincristine도 협죽도과 식물인 일일초(*Catharanthus roseus*)로부터 추출하여 사용하고 있다(Miura et al, 1988). 그러나 대개 용매추출법을 사용하고 있기 때문에 추출공정이 매우 복잡하고 선택성이 떨어질 뿐만 아니라 추출물에 잔존하는 추출용매도 문제점으로 지적된다.

이 두 알칼로이드는 이러한 약효에 의해 수요가 많은 반면 분리정제가 어렵고 기존 추출방식에 의한 대형화가 어려워 매우 비싼 가격에 판매되고 있다. 따라서 vinblastine과 vincristine의 전구물질인 vindoline과 catharanthine을 가지고 합성하여 생산할 수 있는 방법에 대한 관심이 높아져 가고 있다(Scott et al, 1980 ; Kurtney et al, 1988). 이러한 목적의 일환으로 vinblastine과 vincristine의 합성경로의 규명과 더불어 두전구물질의 획득을 위한 연구가 여러 사람들에 의하여 진행되어져 왔다(Scott et al, 1980). 전구물질의 하나인 catharanthine은 Kurz 등에 의해 일일초 배양세포를 이용한 대량생산의 가능성이 있음을 확인한 반면 vindoline은 배양세포에서의 함량이 모세포에서의 함량보다 적음을 알아냈다(Kurz et al, 1987). 이와 같은 이유는 세포내 vindoline 합성을 위한 acetyl transferase와 N-methyl transferase가 발현되지 않았기 때문으로 알려져 있다. 이에 Danieli 등에 의

해 vindoline 합성을 위한 연구가 이루어졌지만 현재까지 그 수율이 낮아 효율적이지 못하다. 따라서 vindoline의 경우 천연식물로부터 직접 추출하는 방법의 개발이 요구되고 있다. 최근 관심을 끌고 있는 초임계유체추출법이 천연식물로부터 유효성분의 추출에 효과적임이 알려져 있다(Schneider et. al., 1980). 초임계유체추출법이 효과적인 이유는 초임계유체의 점도가 기체와 비슷하게 낮으며 확산계수는 액체의 값보다 훨씬 크므로 유효성분을 추출해 내는데 유리하며 밀도는 액체의 값과 비슷하게 크므로 용해력이 크기 때문이다. 또한 초임계유체로 임계온도와 임계압력이 비교적 낮은 이산화탄소는 인체에도 무해하며 안정된 구조로 인화성이 없어 누출되어도 폭발의 위험성이 없다. 따라서 이러한 장점을 이용하여 이미 일일초로부터 초임계유체를 이용한 vindoline 추출에 효과적임을 밝혔다(Lee et. al., 1992).

따라서 본연구에서는 일일초잎으로부터 초임계이산화탄소를 이용한 초임계유체추출로 vindoline 추출의 적정조건을 규명하고자 다양한 추출조건에서 실험을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

일일초 조직중 잎조직만을 실험대상으로 사용하였으며 수분을 제거하기 위하여 60 °C 로 유지되는 건조오븐에 넣고 24시간 건조시켰다. 건조된 일일초는 갈아서 분말로 만들어 실험당 약 7 g씩 정량하여 사용하였다. 입자분포는 ASTM(American Society of Testing and Materials)에서 규정한 mesh number 70인 0.210mm의 입자가 가장 많았으며 중량평균입도는 0.231mm였다. 본 초임계추출실험에서는 추출용매로 99.0% 순도의 이산화탄소를 사용하였으며 분리기에서 추출물을 모으기 위한 용매로는 Aldrich 제품의 GLC 용 99.97% 순도의 methanol을 사용하였다. 보조용매는 Merck 제품의 chromatography용 99.5% 순도의 ethanol을 사용하였다.

실험장치는 크게 이산화탄소 및 보조용매 공급부, 추출부 그리고 회수부의 세부분으로 이루어졌으며 유체흐름식이다(Song et. al., 1992). 이산화탄소는 실린더로 부터 압축기와 압력 조정기를 이용하여 약 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ (1기압 28 °C)의 유속으로 공급하였으며 ethanol은 ISCO의 $\mu\text{-LC500}$ Micro Flow Pump를 사용하여 이산화탄소 유속의 약 3wt.%인 20.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 추출조 입구 전에서 공급하였다. 건조분말의 일일초는 추출효과를 높이기 위하여 3mm 유리구슬과 혼합되어 추출조에 미리 넣었다. 추출조의 온도는 35 °C , 50 °C 그리고 70 °C 로 변화시켰으며 압력은 200 bar 와 300 bar로 변화시켰다. 분리기에 포집된 추출물의 무게를 측정하여 수율을 계산하였다.

추출물에 함유된 알칼로이드의 정량분석은 HPLC을 이용하였다. 초임계 추출을 통해 얻은 추출물은 methanol에 녹여 0.5 μm FH-type Millipore 여과기를 사용하여 잔유물을 제거한 후 역상의 $\mu\text{-Bondapak C}_{18}$ column(30cm x 3.9mm)에 주입하였다. 기타의 HPLC 및 MS의 분석조건은 제 1장의 실험법과 동일하다.

제 3 절 결과 및 고찰

일일초에 함유하고 있는 알칼로이드중에는 구조적으로 유사하여 일반적으로 사용하는 비색법이나 부피분석법을 이용할 수 없다. 또한 이들의 분자량이 커서 가스크로마토그래피 분석이 불가능하다(Grog and Jovavovics, 1977). 분무시약으로 ceric ammonium sulfate (CAS)와 UV 검출을 이용한 TLC (thin-layer chromatography)는 5 ng 이하의 양에 대해서도 예민하게 반응하지만 낮은 정확성을 갖는다(Farnsworth et. al., 1964). 따라서 이와 같은 단점을 극복하기 위하여 최근에는 역상관을 이용한 HPLC로 분석하고 있으며 긴 시간이 요구된 경우에는 역상관으로 분석하기 전에 실리카관을 이용하여 추출물내의 알칼로이드를 세 부분으로 나누어 분석하기도 한다 (Renandin, 1984). 그러나 본 실험에서 얻은 추출물의 경우 일부 성분에 대한 선택성이 있어 역상관을 사용하기 전에 실리카관을 사용할 필요가 없었다. 따라서 기존의 추출법 보다 초임계 이산화탄소를 이용한 추출법이 vindoline과 catharanthine의 분리에 유리하며 공정에 있어서도 약 7 단계를 거쳐야 하는 Renaudin(1984)의 유기용매추출법 보다도 간단하다. 초임계 이산화탄소를 이용한 일일초로부터 획득된 추출물에 대한 정량, 정성분석은 HPLC와 MS로 하였다. 이 결과로부터 추출물에 함유한 물질의 대부분이 vindoline과 catharanthine임을 알 수 있다.

초임계 이산화탄소에 ethanol을 보조용매로 이용하여 일일초로부터 vindoline 추출을 여러 온도, 압력조건에서 행하였다. 모든 실험에서 ethanol의 공급유속은 이산화탄소의 약 3 wt.%인 20.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 이었다. 각 조건에서 얻어진 추출물의 분석결과를 Table 1에서 볼 수 있다. Ethanol을 보조용매로 사용했을 경우 초임계 이산화탄소에 대한 vindoline의 선택성은 압력이 감소함에 따라 증가하는 경향을 보이고 있다. 그러나 70°C의 높은 온

Table 1. Selectivity of vindoline in various conditions

T(°C)	P(bar)	Vindoline% in extract
35	200	67
	300	55
50	200	58
	300	50
70	200	54
	300	57

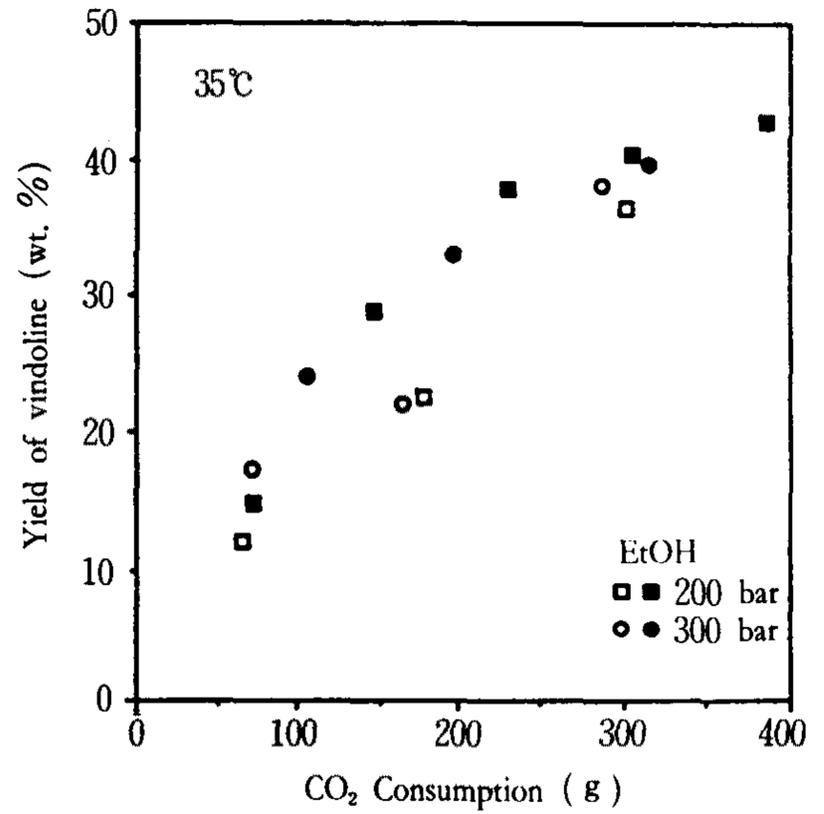


Fig. 1. Comparison of the yield of vindoline obtained by using SC-CO₂ with and without cosolvent at 35°C.

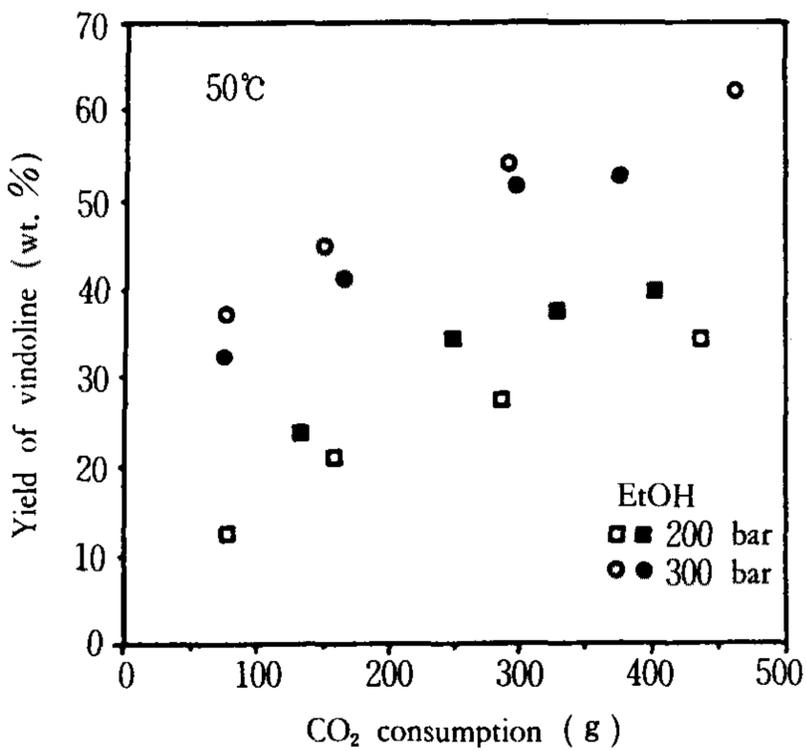


Fig. 2. Comparison of the yield of vindoline obtained by using SC-CO₂ with and without cosolvent at 50°C.

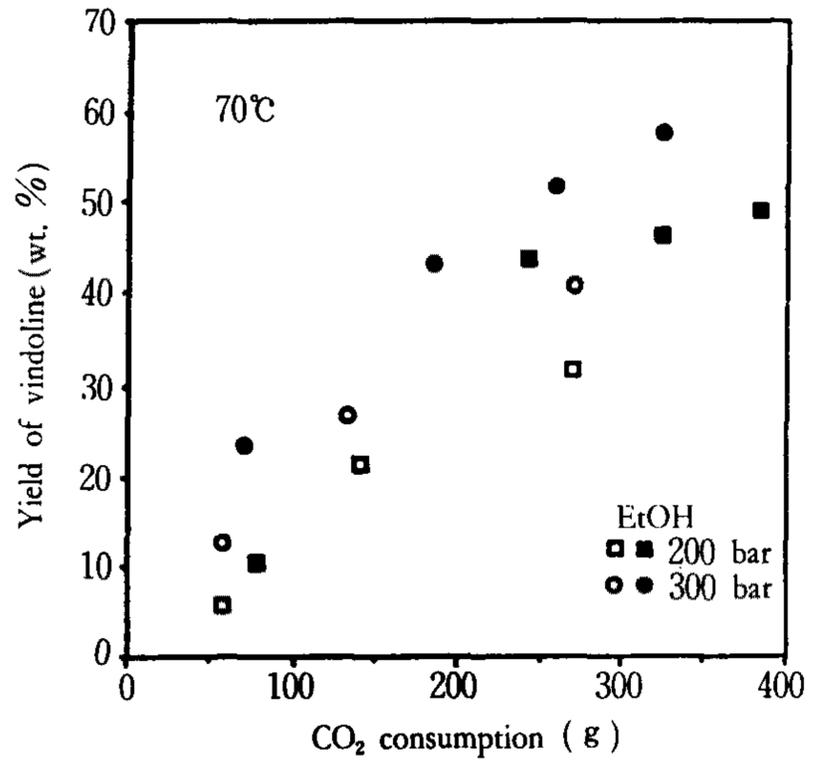


Fig. 3. Comparison of the yield of vindoline obtained by using SC-CO₂ with and without cosolvent at 70°C.

도에서는 이와 반대의 경향을 보였다. 그리고 온도가 증가함에 따른 vindoline의 선택성은 낮은 압력에서 감소하나 높은 압력에서 50-70 °C 에서 다시 증가하는 경향이 있음을 예측할 수 있다. 전체적으로 보조용매를 사용하지 않은 경우(Lee et al, 1992)와 비교해 볼 때 보조용매인 ethanol의 vindoline의 선택성에 대한 영향이 적은 것을 알 수 있다. 따라서 vindoline에 대한 선택성을 증가시키기 위해 다른 보조용매의 선택이나 용해도 상수등을 이용한 예측이 필요하다.

각 조건에 따라 보조용매를 사용했을 경우와 그렇지 않은 경우에 대한 실험결과로부터 초임계 이산화탄소의 소비량에 대한 vindoline 추출 수율의 변화를 Fig. 1, 2 그리고 3에서 나타내었다. 여기서 vindoline의 수율은 Hirata의 (1988) 유기용매 추출법의 결과를 기준으로 계산하였다. 즉 일일초 잎조직으로부터 얻은 vindoline양은 건조질량 1g당 1.8mg을 기준으로 수율을 계산하였다. 여기서 보조용매로 ethanol을 사용했을 경우 50 °C , 300bar에서의 결과를 제외한 다른조건에서의 추출수율은 전체적으로 조금씩 증가하는 경향을 보였다. 또한 온도가 증가함에 따라 추출수율의 증가폭이 컸다. 이것으로 ethanol의 보조용매로서의 효과는 온도에 따라 증가하는 경향이 있음을 알 수 있다. 또한 보조용매의 사용여부와 무관하게 온도와 압력에 대한 vindoline의 추출수율은 이산화탄소에 대한 용해도와 관계하여 이산화탄소의 밀도에 많은 영향을 받고 있음을 확인할 수 있다. 따라서 Fig 1,2 그리고 3에서 볼 수 있듯이 압력이 증가함에 따라 vindoline의 용해도가 증가하여 추출수율은 증가하지만 온도에 대한 영향은 비교적 적게 받음을 알 수 있다. 이러한 결과는 초임계 이산화탄소를 이용한 식물체로부터 유효성분의 추출에 관한 여러 논문에서 이미 알려진 경향과 일치한다(Schneider, 1980).

제 4 절 참고 문헌

- N. R. Fransworth, R.N. Blomster, D. Danratoski, W. A. Meer, and L. V. Cammarato (1964) *Lloydia*, 27(4), 302.
- S. Grog, B. Herenyi, and K. Jovavovics (1977) *J. Chem.* 139, 203.
- K. Hirata, A. Yamanaka, N. Kurano, K. Miyamoto, and Y. Miura (1987) *Agric. Biol. Chem.* 51(5), 1. 311.
- J. P. Kurtney, L.S.L. Choi, J. Nakano, H. Tsukamoto, M. McHugh, and C. A. Boulet (1988) *Heterocycles*, 27(8), 1845.
- W.C.W. Kurz, K.B. Chason, F. Constabel, J.P. Kurtney, L. S. L. Choi, P. Koloziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart, and B. R. Worth (1987) *Plant Medica*, 42, 22.
- H. Lee, W. H. Hong, J. H. Yoon, K. M. Song, S. S. Kwak, and J. R. Liu (1992) *Biotech. Tech.* 6: 127-130.
- Y. Miura, K. Hirata, N. Kurando, K. Miyamoto, and K. Uchida (1988) *Planta Med.*, 54, 18.
- J. P. Renaudin (1984) *J. Chromatography*, 291, 165.
- G. M. Schneider, E. Stahl, and G. Wilke (1980) "Extraction with Supercritical Gases", Verlag Chemie.
- K.M. Song, S.W. Park, W.H. Hong, H. Lee, S.S. Kwak and J.R. Liu (1992) *Biotechnology Progress* (in press).
- A. L. Sott, S. L. Lee, M. G. Culver, W. Wan, T. Hirata, F. Gueritte, R. L. Boxter, H. Nordlov, C. A. Dorschel, H. Mizukami and N. E. Mackenzie (1980) *Heterocycles*, 15(7), 1257.
- Wong, J. M. and Johnston, K. P., (1985) *Biotechnology Progress*, 2(1), 29.

여 백

제 3 장 Catharanthine과 vindoline의 화학적 결합에 의한 vinblastine 합성

제 1절 서론

Vinblastine과 vincristine의 합리적인 생산방법으로 제시되고 있는 것으로는 이들의 전구물질인 vindoline과 catharanthine를 각각 대량생산하는 방법을 일차적으로 확립한 후, 이들을 효소학적 또는 화학적 방법으로 결합하여 이량체 indole alkaloid를 생산하는 방법이다. 두가지 전구물질 중 vindoline은 식물체내 함량이 건물중의 0.12%로 비교적 높으며 초임계 이산화탄소에 대해 높은 선택성을 나타내므로 효과적으로 추출이 가능하다(Lee et. al., 1992; 송 등, 1992; Song et. al., 1992). 다른 전구물질인 catharanthine은 식물체내 함량이 0.003%로 낮아 세포배양에 의한 생산연구가 많이 시도되어 왔다. Catharanthine 생산은 일일초 모상근(hairy root) 배양 및 현탁배양세포로부터 선발한 catharanthine 고생산 세포주를 이용하여 대량생산이 가능하다(Kim et. al., 1991; Jung et. al., 1992; Jung et. al., 1992).

단량체 indole alkaloid인 vindoline과 catharanthine은 peroxidase에 의한 효소학적 결합과 3가철이온에 의한 화학적 결합으로 vinblastine의 합성이 가능하다(Goodbody et. al., 1987; Vulkovic et. al., 1988)). 이량체 indole alkaloid의 수율과 반응실험의 난이도를 고려할 때 화학적 결합이 효소학적 결합보다 유리하다. 화학적 결합에서는 충분한 양의 3가철이온의 존재하에서 3',4'-anhydrovinblastine을 경유하여 vinblastine으로 결합된다(Fig. 1). 이 때 vinblastine의 수율은 pH, 반응온도, 3가철이온(Fe^{+3})의 농도 및 반응시간을 조

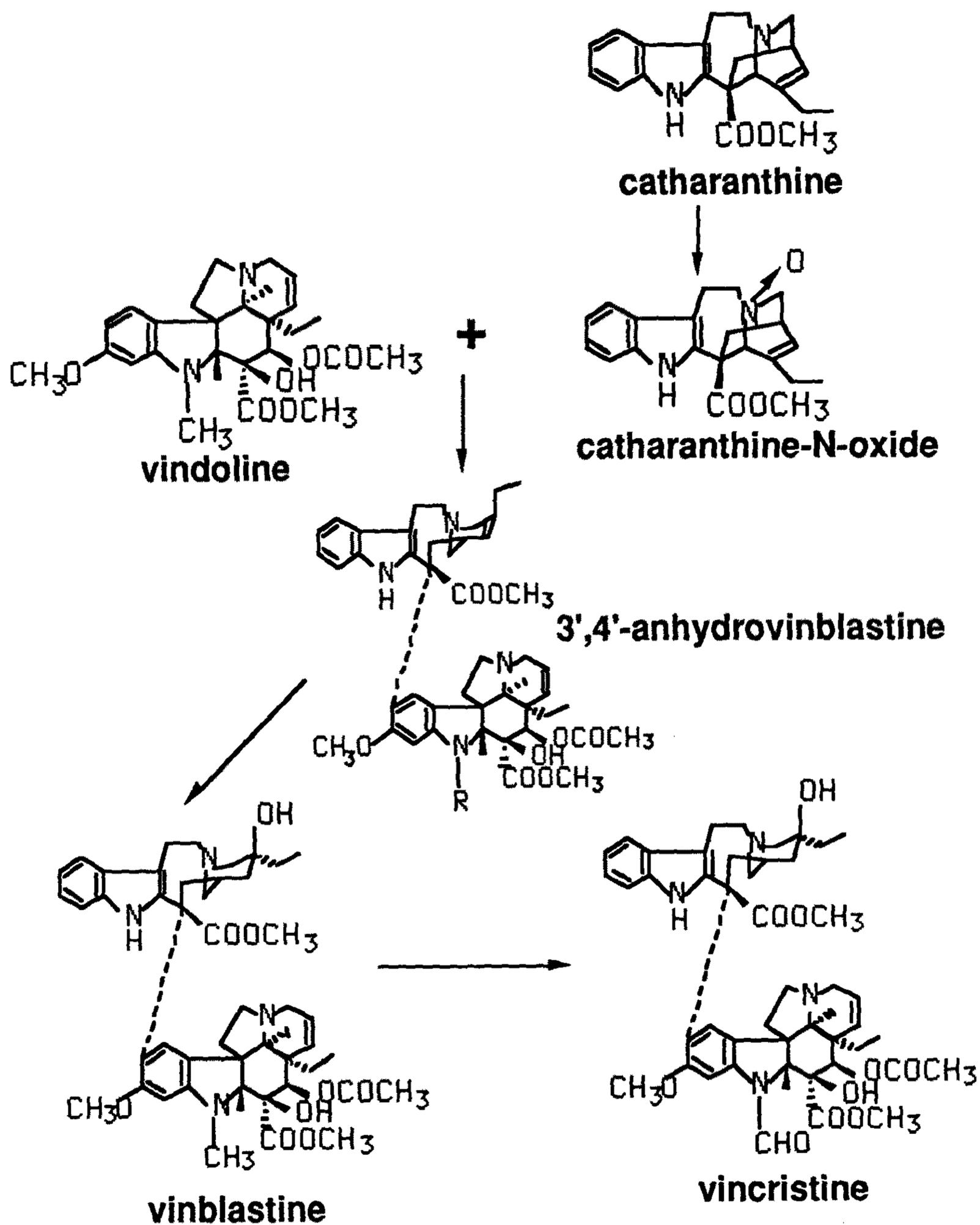


Fig. 1. The overall coupling reaction scheme.

작하여 최적화할 수 있다(Vulkovic et. al., 1988). 이때 부적절한 반응조건은 catharine, leurosine, vinamidine 및 3-R-hydroxyvinamidine과 같은 원하지 않는 이량체를 생성한다.

따라서 본 연구에서는 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline과 일일초 모상근 배양에 의해 생산된 catharanthine을 3가철이온(Fe^{+3})을 사용하는 화학결합반응에 의한 vinblastine 생산에 관한 실험을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. TLC(Thin-Layer Chromatography)에 의한 indole alkaloid의 정제

초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline과 일일초 모상근(hairy root)배양에 의해 생산된 catharanthine을 분취용 TLC plate(Silica gel 60 F₂₅₄, 200 × 200mm, Merck)를 사용하여 2단계로 정제하였다. 1차 전개액으로 100% methanol을, 2차 전개액으로 BAW(n-butanol : acetic acid : water, 4:1:1) 혼합액을 사용하였다. 각 단계에서 전개가 끝난 후에 CAS(Ceric Ammonium Sulfate) 시약으로 발색시켜 전개여부 및 TLC plate상의 전개위치(R_F)등을 확인하였다(Fransworth and Hilinski, 1965; Fransworth et. al., 1964). 각 단계 전 후에 정제효율을 계산하기 위하여 각 sample 중 일부를 취해 HPLC로 분석하였다. HPLC분석은 Jung등(1992)의 방법에 따라 ODS 컬럼(m-Bondapack C₁₈ column, 30×0.39cm)을 사용한 역상 크로마토그래피로 하였다.

2. Vindoline과 catharanthine의 화학결합에 의한 vinblastine의 생산

0.1M glycine 완충액(4°C에서pH 2.0) 5mL에 정제한 vindoline과 catharanthine

을 각각 0.3 mg씩 넣은 반응시료를 미리 4 °C에서 냉각하였다. 반응액(5mL)에 40 mM(20~100mM)의 농도가 되도록 1.2M 염화철(FeCl_3)수용액을 촉매로 첨가하여 4 °C에서 2 시간동안 반응시킨 후에 생성물의 환원이 일어나도록 sodium borohydride(NaBH_4)를 첨가하였다. 반응이 정지된 후에 pH가 약 10이 되도록 14M 암모니아수 0.1mL를 가했다. 반응에 의해 생산된 이량체 indole alkaloid는 HPLC등급의 ethyl acetate 5mL로 세번 추출되었다. 유기용매를 감압하에서 증발시키고 HPLC등급의 methanol 300 μ L로 시료를 녹였다. 각각의 반응생성물들의 분석은 앞에서 단량체 indole alkaloid를 정제할 때와 같았으나, 이량체 indole alkaloid에 대해 검출파장은 UV 226nm이었다. 또한 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline을 정제하지 않은 상태로 이용하여 위와 같은 실험을 수행하였다.

제 3 절 결 과

1. TLC에 의한 Vindoline 과 Catharanthine의 정제

초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline과 일일초 모상근으로부터 유기용매에 의해 추출된 catharanthine을 2단계 TLC로 정제하였다. 정제하기 전 조추출물에 포함된 vindoline의 함량은 50%이었으며, 1단계 TLC정제 후에는 60%이었고 2단계 TLC정제 후에는 97%로 매우 순수하게 정제되었다. CAS시약으로 발색시켰을 때 vindoline은 순간적으로 심홍색을 나타내다가 점차 중앙에 노랑색이 생겼다. Catharanthine은 순간적으로 중앙에 노란색이 있는 파란색을 띠다가 점차 노란색이 증가하여 5분 후에는 가장자리에 얼은 파란색만 남고 완전히 노란색으로 변하였다.

유기용매에 의한 조추출물에 포함된 catharanthine의 함량은 7~8%로 낮았으나, 1단계 TLC정제 후에는 37%이었고 2단계 TLC정제 후에는 75%까지 증가하였다. Vindoline의 정제효율은 94%로 거의 모두 회수되었으며 catharanthine의 정제효율은 55%로 절반이 조금 넘는 회수율을 보였다.

2. Vindoline과 catharanthine의 화학결합에 의한 vinblastine의 생산

앞선 실험에서 정제된 단량체 indole alkaloid인 vindoline과 catharanthine은 3가철이온(Fe^{+3})을 촉매로 사용하였을 때 효과적으로 결합되었다. 주요 반응 생성물은 3',4'-anhydrovinblastine 과 vinblastine이었으며(Fig. 2), 반응으로부터 leucosine과 같은 원하지 않는 이량체도 함께 생성되었으나 그 양으로 보아 문제가 되지는 않았다. 3가철이온(Fe^{+3})의 source로는 염화철($FeCl_3$)수용액을 사용하였으며, 촉매로 가장 유용한 농도는 40mM이었다.

반응은 선택된 반응조건에 관계없이 sodium borohydride($NaBH_4$)와 같은 환원제를 일시에 첨가함으로써 정지되었다. $NaBH_4$ 를 첨가하는 시기는 주어진 반응조건에 따라 달라졌다. 예를 들면, 40mM $FeCl_3$ 와 glycine 완충액을 4 °C에서 사용하였을 때 vinblastine의 농도가 최대가 되게 하는 환원제 첨가 시기는 반응이 시작된 후 2시간이 경과될 때였다. 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline(50%)을 정제하지 않고 같은 방법으로 반응시켰을 때에도 반응은 효과적으로 일어났으나 그 수율은 조금 낮았다. 화학결합적방법에 의해 생산된 화합물을 정제하여 FAB mass spectrum에 의해 분석한 결과 authentic vinblastine의 분자량과 일치하여(Fig. 3) HPLC에 의해 확인된 화합물이 vinblastine임을 확인하였다.

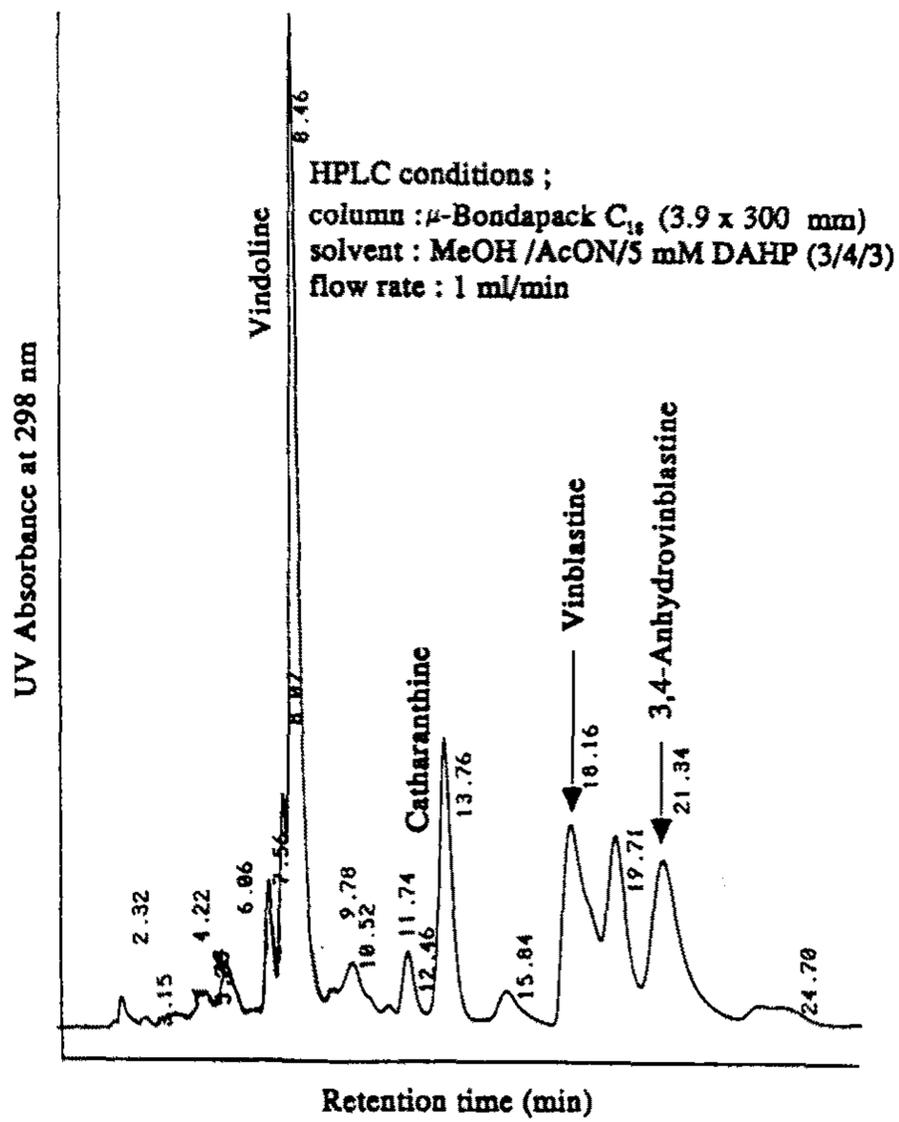


Fig. 2 HPLC chromatogram of coupling reaction products.

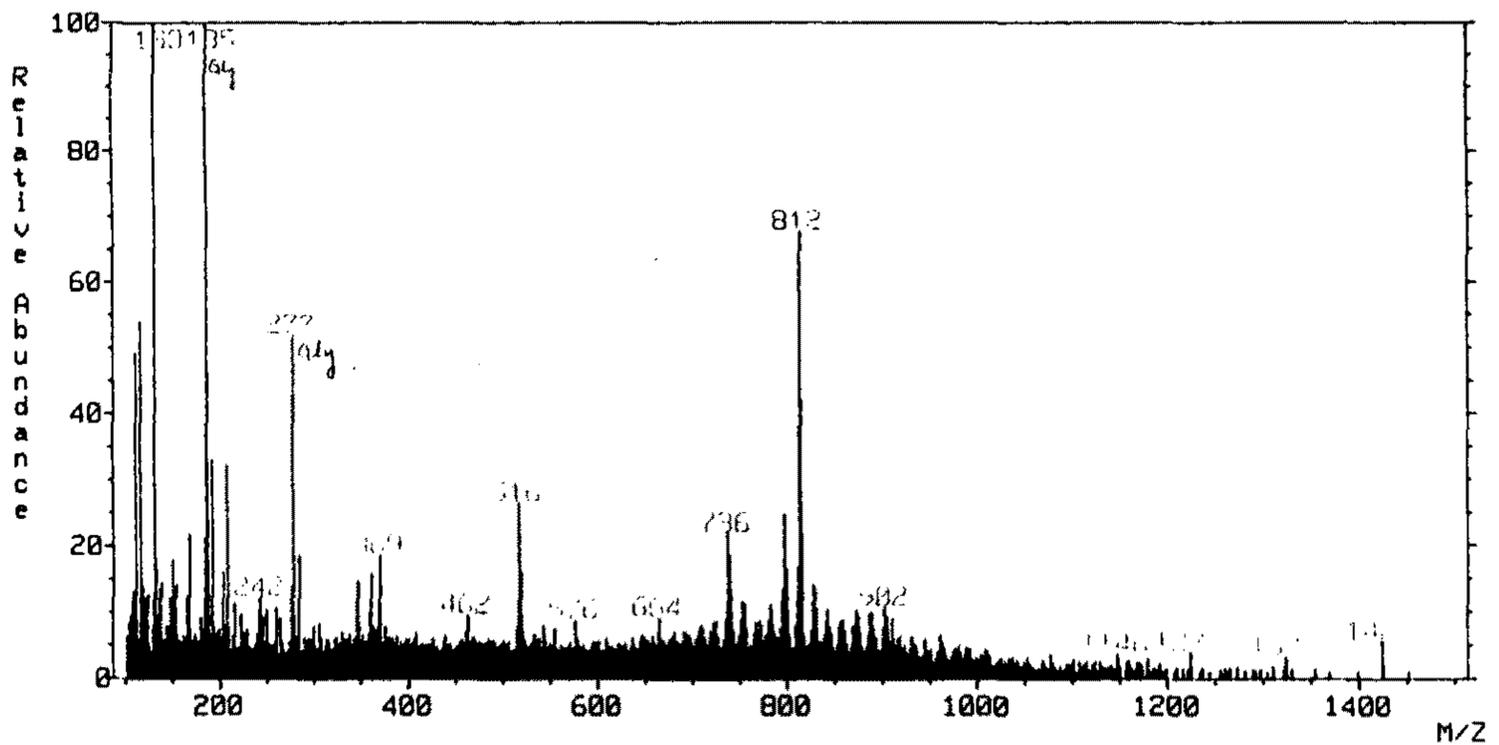


Fig. 3. FAB-Mass spectrum of vinblastine produced by chemical coupling reaction.

제 4 절 고 찰

본 연구에서 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline과 일일초 모상근(hairy root) 배양에 의해 생산된 catharanthine을 2단계에 걸친 TLC(Thin-Layer Chromatography)로 정제하고, 이들을 3가철이온(Fe^{+3})을 촉매로 화학적으로 결합시켜 vinblastine을 효과적으로 생산할 수 있다는 것을 확인하였다.

촉매로 사용되는 3가철이온(Fe^{+3})의 source로 이용가능한 것으로는 $Fe_4(P_2O_7)_3$, $NH_4Fe(SO_4)_2$, $FePO_4$, $FeCl_3$, 및 $Fe(NO_3)_3$ 등이며 이 중 본 실험에 사용된 것은 $FeCl_3$ 이었다. 3가철이온(Fe^{+3})은 catharanthine과 complex를 형성하여 vindoline과 적절한 결합을 도모하는 electron shift를 야기한다. 따라서 3가철이온(Fe^{+3})의 농도는 상대적인 catharanthine의 농도와 함께 반응의 초기 제어 인자이다. 또한 반응은 높은 온도($20^{\circ}C$ 이상)에서 보다는 낮은 온도($4^{\circ}C$)에서 효과적으로 진행되었다. 그것은 높은 온도에서는 반응이 빨리 진행되나 원하는 이량체의 농도가 최대일 때 반응이 정지되도록 하기위한 환원제 첨가시기의 선택이 매우 어려우며, 더욱이 일반적으로 높은 온도에서는 생성되는 이량체와 대기중의 산소가 낮은 온도에서 보다 훨씬 증가된 반응성을 가지기 때문이다. 따라서 $4^{\circ}C$ 정도의 낮은 온도에서 반응속도는 보다 효과적으로 제어되며 반응을 정지시키는 환원제의 첨가시기도 보다 유연성이 있게 된다. 대부분의 실험은 정제한 vindoline과 catharanthine을 반응물로 사용하였으나, 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline을 반응물로 사용하였을 때도 생성물의 조성이 다소 복잡했으나 결과는 비슷하였다.

제5절 참고문헌

- H. Lee, W.H. Hong, J.H. Yoon, K.M. Song, S.S. Kwak and J.R. Liu (1992),
Biotech. Tech., 6(2), 127-130.
- 송규민, 박상우, 이훈, 홍원희, 곽상수, 유장열 (1991), *한국생물공학회지*
6(4), 407-412.
- K.M. Song, S.W. Park, W.H. Hong, H. Lee, S.S. Kwak and J.R. Liu (1992),
Biotech. Prog., (in press).
- S.W. Kim, K.H. Jung, S.S. Kwak, H.S. Choi, C.H. Choi and J.R. Liu (1991),
Korean J, Biotechnol. Tech., 6, 1-7.
- K.H. Jung, S.S. Kwak, S.W. Kim, C.Y. Choi, G.S. Heo and J.R. Liu (1992),
Biotechnol. Tech., 6: 305-308.
- K.H. Jung, S.S. Kwak, S.W. Kim, H. Lee, C.Y. Choi and J.R. Liu (1992),
Biotechnol. Letters,
- A.E. Goodbody, T. Endo, J. Vulkovic, J.P. Kutney, Lewis S.L. Choi and M.
Misawa (1987), *Planta Medica.*, 196, 136-140.
- John Vulkovic, et al. (1988), *United States Patent*, 4 778 885.
- N.R. Fransworth and I.M. Hilinski (1965), *J. Chromatog.*, 18, 184-188.
- N.R. Fransworth, R.N. Blomster, D. Damratoski, W.A. Meer and L.V.
Cammarato (1964), *Lloydia*, 27(4), 302-314.

제 4 장 Indole alkaloid 생산성 향상을 위한 분자생물학적 기초 연구

제1절 Indole alkaloid 생합성관련 유전자들의 cDNA 합성

1. 서론

일일초는 항암제로 사용되는 vinblastine과 vincristine등을 비롯한 다양한 indole alkaloid를 생산한다 (McKnight et.al., 1991). 이들 indole alkaloid의 생합성에 대해서는 부분적으로 밝혀져 있다. 특히tryptophan에서 tryptamine으로 전환되는 과정과 tryptamine과 secologanin이 합쳐져서 strictosidine으로 되는 과정은 관련 유전자의 cloning이 이미 완결되었다 (Mcknight et.al., 1990; DeLuca et al., 1989). 전자는 관련효소를 정제하여 antibody를 제조한 후 immunoscreening을 하여, 후자는 *Rauwolfia serpening*의 관련 유전자 sequence에 oligonucleotide probe 를 만들어 screening하여 유전자를 cloning할 수 있었다. 두 과정은 indole alkaloid 생합성 첫 단계로 1000여 종의 indole alkaloid 의 전구체인 strictosidine이 만들어 지는 과정이다. 따라서 gene expresion level도 다른 indole alkaloid생합성 과정보다 높을 것이며 관련 효소의 양도 많을 것이다. 그러나 특정 indole alkaloid를 만드는 과정에서는 관련 효소의 양이 매우 적을 것으로 추측된다. 또한 중간 단계의 생합성 과정이 명확히 알려진 경우가 드물어 효소를 정제한 뒤 그 단백질을 목표로 유전자를 cloning하기가 어렵다. 따라서 단백질에 대한 정보가 없는 상황에서도 유전자를 cloning할 수 있는 방법이 요구되는 것이다. 일일초현탁배양세포에서 indole alkaloid가 생산될 때의 조건은 indole alkaloid가 생산되지 않을 때의 조건과는 다르다. 즉 배지의 조건이 달라지면서 일일초배양세포는

indole alkaloid를 생산한다. 이는 developmental stage에 따라 gene expression이 조절되는 경우나 cell type specific gene expression의 경우와 유사하다. 이렇게 developmental stage에 따라 조절되는 유전자나 cell type에 따라 특이하게 발현되는 유전자는 관련 단백질에 대해 알려진 사실이 거의 없을 때 substracted cDNA library나 differential screening등의 방법으로 cloning되어 왔다. (Timberlake et.al., 1980 ; Davis et.al., 1984 ; Koshland et.al., 1981 ; Sargent and Dawid, 1983 ; Nagata et.al., 1989 ; Pillay et.al., 1990 ; DeLuca et.al., 1991 ; Salamini et.al., 1991)

Differential screening은 특정 유전자가 발현되는 세포 혹은 발생단계에서 cDNA library를 만든 다음, 발현전후의 세포에서 추출한 mRNA로 cDNA probe 혹은 RNA probe로 library를 screening하여, 발현 후 probe에 특이하게 hybridization 되는 유전자를 찾는 방법이다. 본 연구에서는 이 방법을 채택하여 일일초현탁배양세포를 사용하여 indole alkaloid 합성관련 유전자를 찾고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. Total RNA 및 mRNA 분리

실험에 사용한 indole alkaloid 고생산세포주는 Kim et al (1991)이 개발한 VPC-10을 사용하였다. 생산배지에서 5, 7, 9, 11일된 catharanthine 고생산성 세포를 수거하여 CsCl 초원심분리방법(Glisin et al., 1974; Chirgwin et.al., 1979; Han et.al., 1987)으로 total RNA를 분리하였다. 각 날짜의 세포 5-10 g을 액체질소로 얼리고 막자사발에서 곱게 갈았다. GIT buffer (4.0 M guanidium thiocyanate, 0.1 M Tris. HCl, pH 7.5 ; 5ml / g sample)에 β -mercapto

-ethanol을 1%가 되도록 첨가하고 가루로 만든 sample을 넣었다. Homogenizer로 균일하게 분쇄한 다음 20%(w/v) N-lauroyl sarcosine을 넣어 최종농도가 2%(w/v)가 되도록 하였다. 원심분리 하여 pellet을 제거하였다. CsCl 10 ml에 sample을 loading하고 초원심분리를 24,000 r.p.m. 으로 36 시간 동안 수행하였다. 하얀 DNA band까지 CsCl를 제거하고 DEPC로 처리한 2차 증류수로 2-3회 washing을 하였다. 나머지 CsCl cushion을 제거하고 70% EtOH로 2-3회 washing 후 400 μ l의 0.25% SDS에 RNA pellet을 suspension하였다. Chloroform/butanol(4/1,v/v) extraction 을 중간층에 하얀 band가 없어질때까지 수행하였다. 중간층을 모아서 70 °C 에서 10분간 두었다가 다시 chloroform/butanol extraction을 하였다. Ice-cold absolute EtOH를 가하여 RNA를 precipitation시키고 13,000 r.p.m. 에서 원심분리하여 pellet을 얻은 뒤 70% EtOH로 한 번 washing 하였다. Pellet을 DEPC처리한 DDW에 suspension하였다. mRNA는 total RNA에서 oligo d(T) cellulose column chromatography로 분리하였다.

2. 2. Denaturing gel electrophoresis

Total RNA의 약 10-30 μ g을 DMSO 6 μ l, 0.1 M NaPO₄ 1.2 μ l, 6M glyoxal 2 μ l 와 섞어 50 °C 에서 1시간동안 반응시킨 뒤 10mM NaPO₄ buffer(pH 7.4)에 녹인 1.2% agarose gel에 loading하여 전기영동을 수행하였다(Maniatis et.al., 1989). 전기영동을 하는 동안 polystatic pump로 tank buffer (10 mM NaPO₄, pH 7.0)를 계속 순환시켰다. 50 mM NaOH에 20분간 둔 뒤 0.5 M ammonium acetate 가 든 EtBr (1 μ g/ml) 용액에서 staining하고 water에서 destaining하였다.

2. 3. cDNA library 제조

cDNA library는 생산 배지에서 키운지 9일째 되는 세포에서 얻은 mRNA에서 만들었다. cDNA는 cDNA synthesis system plus (Amersham)을 이용하여 합성하였으며 library는 cDNA cloning system (Amersham)을 이용하여 λ gt10의 EcoRI site에 cDNA를 ligation시켜 제조하였다.

2. 4. Probe제조

Differential screening에 사용한 probe는 PCR을 이용하여 제조하였다. 생산배지에서 배양한 지 5, 9일째 되는 세포에서 mRNA를 분리하여 double stranded cDNA를 만들었다. EcoRI adapter를 ligation시키고 이를 PCR template로 사용하였다. 10 X reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris.Cl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂) 5 μ l, 2 mM dGTP, dATP, dTTP 혼합액 5 μ l (최종농도 200 μ M), 1 mM dCTP 0.7 μ l (최종농도 200 μ M), 3.3 M ⁻³²P-dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) 15 μ l (최종농도 0.99 M), 5, 9일 EcoRI adapted cDNA 각각 1 μ l (10-20 ng), primer (16 mer, 265 pmole/ μ l) 0.8 μ l (최종 200 pmole), DDW 21.5 μ l 를 0.5 ml짜리 tube에 넣고 30 μ l의 mineral oil를 reaction solution 위에 얹었다. Thermal cycle은 94 °C 5분, 52 °C 2분, 72 °C 3분 30초로 1회, 94 °C 1분, 52 °C 2분, 72 °C 3분 30초로 30회, 94 °C 1분, 52 °C 2분, 72 °C 10분으로 1회의 cycle로 진행하였다. Chloroform 50 μ l 를 섞은 뒤 상층액은 새로운 tube로 옮겼다. Probe 1 μ l를 10배 희석하고 whatman DE 81 paper 2장에 점적하여 그중 한 장을 0.5 M NaHPO₄ 로 6번, DW로 2번, 95% ethanol로 1번 washing하여 Cerenkov counting을 하였다.

Northern hybridization에 사용한 probe는 random primer를 이용한 방법으로 제조하였다. Template DNA 2 μ l (약 400 ng)에 N6 primer 2.4 μ l (60 ng) 을

섞고 10 μ l glass capillary tube로 옮겼다. 끓는 물에 7분간 둔 뒤 즉시 ice/ethanol bath에 두었다. 2 μ l klenow reaction buffer (0.5 M Tris Cl (pH 7.6), 0.1 M MgCl₂), 5 μ l dNTP mix (dATP, dGTP, dTTP, 최종농도 0.25 mM), 3 μ l ³²P dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham), 1 μ l Klenow fragment (7 units)를 첨가하고 DDW로 20 μ l로 맞추었다. 37 °C에서 1시간동안 반응시키고 30 μ l의 stop solution(0.1% SDS, 10 mM Tris Cl(pH 7.5), 1 mM EDTA)으로 반응을 중지시켰다.

2. 5. Spun column chromatography

Probe에서 DNA로 incorporation 되지 않은 α -³²P dCTP를 제거하기 위해서 spun column chromatography를 수행하였다. 1 ml 주사기에 적당량의 glass wool로 주사기의 입구를 채운 뒤 sephadex G-50을 넣고 3,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. DDW로 1번 washing하고 probe sample을 loading하여 3,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다.

2. 6. Differential screening

90 mm plate에 plaque가 200-300개 되도록 배양한 후 nitrocellulose filter로 2개의 replica를 얻었다. 처음 replica는 90초, 두번째는 150초 동안 plaque를 filter로 transfer 시켰다. Denaturation solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 1분, neutralizing solution (0.5 M Tris.Cl, pH 8.0, 1.5 M NaCl)에 5분, 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M Na-citrate)에서 3분간 띄워둔 후에 3MM paper위에서 말렸다. 80 °C vacuum oven에서 2시간 동안 baking 하였다. 50% formamide를 포함한 prehybridization solution (6 X SSPE, 5 X Denhardt's reagent, 0.5% SDS, 100 g/ml denatured, Herring sperm DNA, 50% formide)을 82 mm filter당 0.5 ml씩 넣고 42 °C 에서 2시간 동안 prehybridization을 수행하였다. 5, 9일째 배

양하여 얻은 세포에서 분리한 mRNA로 만든 double stranded cDNA probe (specific activity, $\geq 1 \times 10^7$ cpm/g ; 8.5×10^5 cpm/82 mm filter)으로 42 °C 에서 70시간 동안 hybridization을 하였다. Washing은 2 X SSC, 0.1% SDS 로 5분씩 4회, 65 °C 1 X SSC, 0.1 % SDS로 30분간 1회, 65 °C 0.2 X SSC, 0.1 % SDS로 30분간 1회 하였다. 9일째 probe가 더 강하게 binding하는 plaque를 골라 *E.coli* NM514를 배양한 plate에 점적하여 다시 plaque를 얻었다. 5, 9일 probe로 다시 hybridization하였다.

2. 7. Northern hybridization

5, 9일 total RNA 약 30 g을, size marker (DNA를 HindIII로 처리한 DNA) 1.25 μ g을 denaturing gel electrophoresis하였다. 20 mM NaOH용액에서 10분간 두었다가 0.5 M (NH₄) acetate를 포함한 EtBr solution에서 staining하고 사진을 찍었다. 20 X SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na.citrate)를 transfer buffer로 사용하였으며 buffer에서 부터 차례대로 긴 3 MM paper 3장, 겔보다 약간 큰 3 MM paper 3 장, 겔, nitrocellulose filter (BioTrace, Gelmann Sciences), 3 MM paper 3장, 5-8 cm 두께의 화장지 를 올려놓았다. 맨 위에는 300 g 짜리의 물건을 두었다. 12시간 동안 transfer를 시키고 3 MM paper 사이에 넣고 80 vacuum oven에서 2시간 동안 baking하였다.

Prehybridization 을 2시간 동안 수행하고 probe (2 x 10⁶ c.p.m.)를 넣고 48 시간 동안 hybridization을 하였다. 이때 사용한 solution은 differential screening에 사용한 prehybridization solution과 동일하였다.

2. 8. λ DNA 분리

E. coli NM514 균주를 maltose가 0.4% 함유된 LB broth에서 밤새도록 키웠다. 그중 1 ml를 LB broth(maltose 0.4%) 50 ml에 넣고 37 에서 약 3-4시간 동

안 배양하였다. 6,000 r.p.m. 에서 5분간 원심분리하고 cold 10 mM MgSO₄ 10 ml에 suspension하였다. 한 plaque에 200-300 μ l의 준비된 E. coli NM514균주를 섞어 37 °C 에서 약 10시간 동안 배양하였다. 200 μ l chloroform을 넣고 30분간 더 배양하고 DNase와 RNase를 1 g/ml되도록 가하고 1시간 동안 37 °C 에서 반응시켰다. NaCl (2.92 g/50 ml culture)을 녹이고 얼음 속에 1시간 두었다가 12,000 r.p.m. 에서 20분간 원심분리하였다. Pellet은 제거하고 PEG 6000 (Merk) (5 g/50 ml culture)을 넣고 얼음속에서 2-3시간 두었다. 11,000 r.p.m. 에서 원심분리하고 pellet을 TE에 녹인 후 chloroform extraction을 하였다. DNase, RNase처리하여 3시간 동안 37 °C에서 반응시키고 2.5M NaCl이 든 PEG 6000을 동일부피로 섞었다. 얼음속에서 2시간 동안 둔 후에 13,000 r.p.m. 에서 원심분리하였다. TE에 suspension하고 1% SDS 를 1/100 부피로 넣고 68 °C 에 5분간 두었다. 1/50부피의 5 M NaCl를 넣고 phenol extraction을 4-5시간 동안 수행하였다. Chloroform extraction을 하고 phenol/chloroform extraction 을 수용액층과의 사이에 하얀 debris가 없어질 때까지 반복하였다. Isopropanol precipitation시키고 TE에 녹였다.

2. 9. Subcloning 및 recombinant plasmid DNA 분리

λ DNA를 EcoRI으로 처리하고 3% polyacrylamide gel electrophoresis을 하여 insert를 확인하고 elution하였다. EcoRI, CIAPase로 처리한 pUC19과 ligation 시킨후 competent E.coli JM83에 transformation시켰다. MacConkey agar plate (50 μ g ampicillin/ml 함유)에서 밤새도록 배양하였고 색 colony를 10 ml LB (100 μ g ampicillin/ml 함유)에 접종, 배양하였다. recombinant plasmid DNA는 alkaline method로 분리하였다. (Birnboim ,H.C.and Doly,J., 1979)

3. 결과

3. 1. Total RNA 및 mRNA 분리

생산배지에서 5,7,9,11 일째 현탁배양한 세포에서 분리한 total RNA의 양은 각각 g sample 당 453.1 μg , 246 μg , 53.5 μg , 41.9 μg 이었다. RNA의 양은 260nm에서 optical density를 측정하여 정하였다. 배양한 날짜가 증가함에 따라 급속히 RNA양이 감소하는 현상을 보였다.(Fig.1) Denaturing gel electrophoresis를 해 보았을 때 28S 와 18S band가 뚜렷하게 관찰되어 RNA의 파괴가 거의 없었음을 알 수 있었다.(Fig.2) Total RNA의 경우, 280nm에서 측정된 absorbance에 대한 260nm에서의 absorbance 비는 1.6-3.0, mRNA는 1.68-2.7이었다. mRNA가 total RNA 중 차지하는 비율은 1.8-2.6 % 이었다.(Fig.1)

3.2 . cDNA library 제조

생산배지에서 9일째 현탁배양한 세포에서 분리한 mRNA로 library를 제조하였으며 titer는 약 20만 pfu이었다.

3.3. Differential screening

Plate당 300-400 pfu이 되도록 배양하여 총 약 1만 pfu을 screening하였다. 9일째 세포의 cDNA로 만든 probe에 특이하게 binding하는 plaque는 240개로 screening한 plaque의 2 % 정도였다. Host인 E.coli NM514를 미리 배양한 plate에 점적하여 다시 differential screening을 했을 때 4개가 다시 9일 probe에 선택적으로 binding하였다.(Fig.3)

3. 4. Northern hybridization

Differential screening에서 얻은 4개의 plaque에서 insert를 분리하여 pUC19

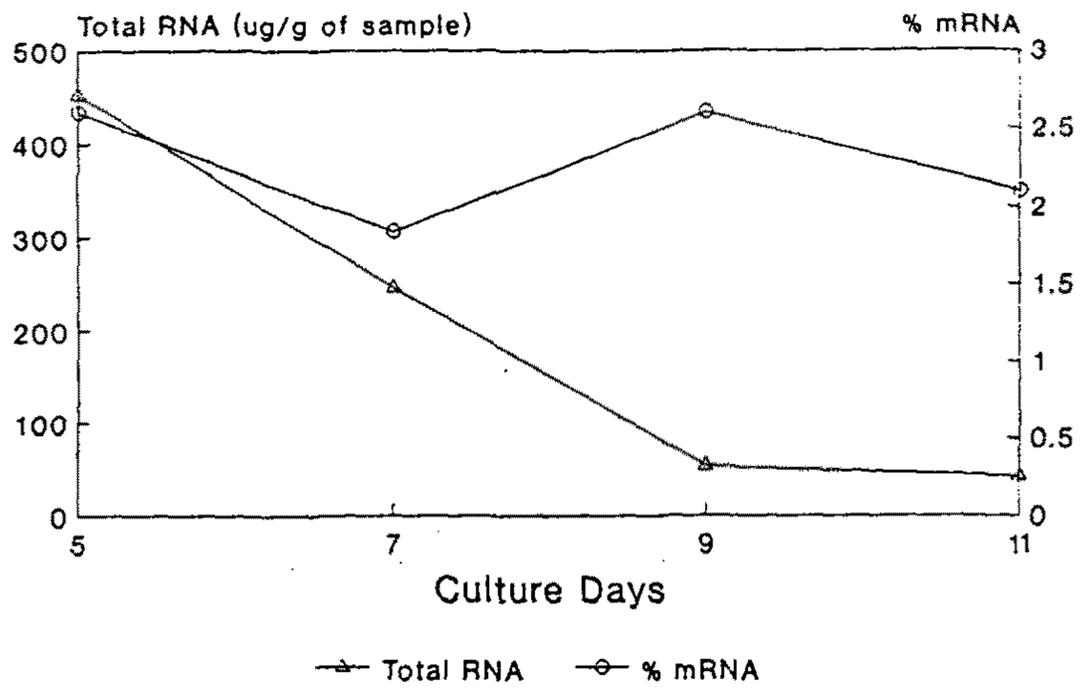


Figure 1. Change of total RNA concentration.

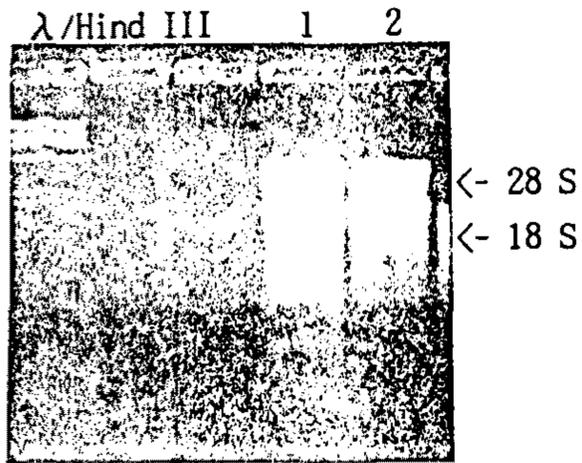


Figure 2. Gel electrophoresis pattern of total RNA isolated from cells cultured for 9 days in the production medium.

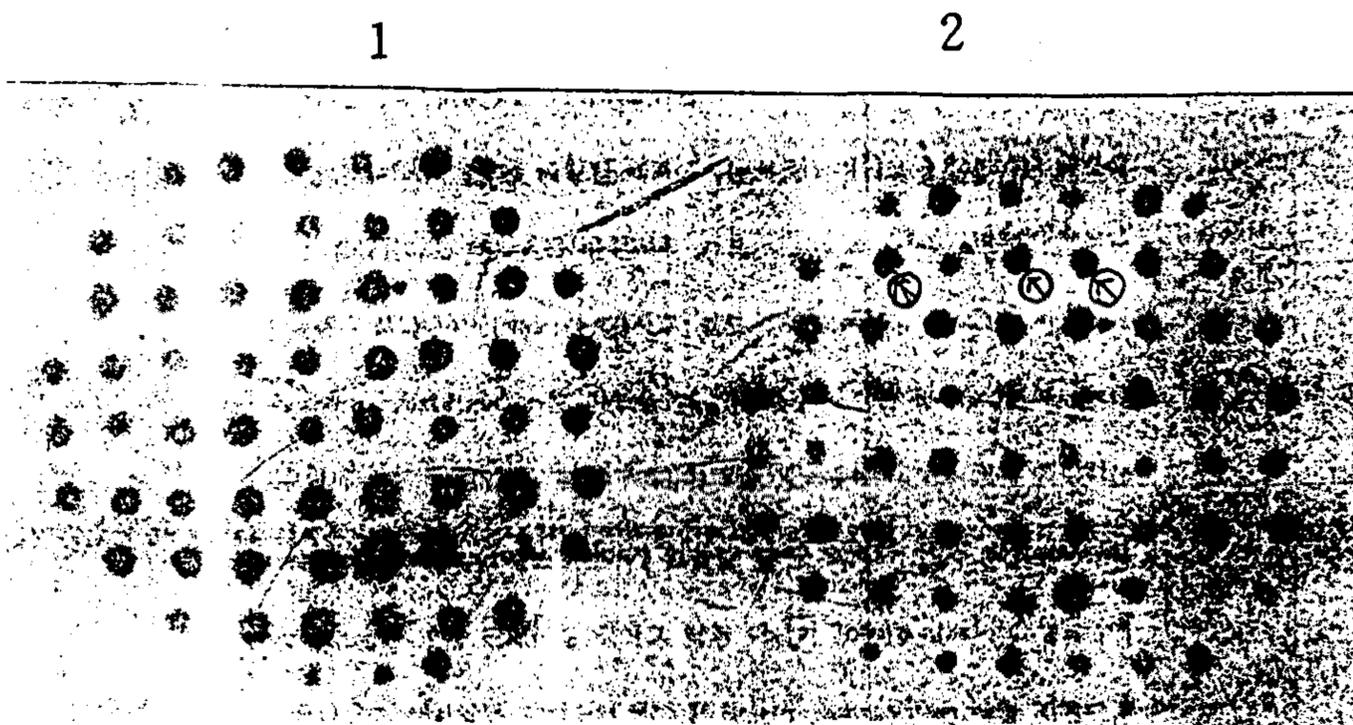


Figure 3. Differential screening. 1 and 2 denotes the hybridization results of 5 and 9 days of cells as probe, respectively. The arrows indicate the strong hybridization plaques in 9 days compared to that of 5 days.

에 subcloning한 뒤 random primer method로 probe를 만들었다. 5일과 9일 total RNA 약 30 μg 을 denaturing gel electrophoresis하여 nitrocellulose filter에 binding시키고 앞의 probe로 hybridization하였다. probe가 hybridization된 하나의 band가 확인되지만 5일, 9일 total RNA에서 band의 세기는 거의 차이를 보이지 않았다.

4. 고찰

약 만개의 plaque를 대상으로하여 differential screening을 수행한 결과 생산 배지에서 5일째 배양한 세포에서는 발현되지 않고 9일이 지난 세포에서는 발현된다고 생각되는 유전자를 가진 plaque 4개를 찾았다. 그러나 이들중 하나만이 insert를 가지고 있었으며 insert를 probe로 사용하여 Northern hybridization을 하였을 때 band의 세기는 5일과 9일의 total RNA에서 차이가 없었다. 따라서 5일과 9일 세포에서, 이 insert에 해당하는 transcription level에는 차이가 없음을 알 수 있었다. 향후 differential screening을 계속 진행시킬 것이고 이와 더불어 indole alkaloid 생합성에 관여한다고 생각되는 단백질의 항체를 만들어 immunoscreening을 진행하고자 한다.

생산배지에서 현탁배양한지 5일에서 11일로 감에 따라 cell mass는 증가하지만 total RNA의 양과 mRNA 양은 감소한다. 그런데 모든 종류의 mRNA가 동일한 정도로 감소할 수도 있겠지만 그렇지 않을 수도 있다. 어떤 특정 mRNA가 더 잘 분해되는 경우 각 mRNA들이 전체 mRNA에서 차지하는 율이 달라질 수 있다. 이런 경우 Northern hybridization을 했을 때, 실제로는 transcription level이 달라지지 않았음에도 9일째 세포에서 더 많이 발현되는 것처럼 결과가 나올 수 있다. 따라서 또 다른 실험으로 실제로 발현정도가 틀리다는 것을 증명해야 할 것이다.

5. 참고문헌

- Bartels, D., Engelhardt, K., Roncarati, R., Schneider, K., Rotter, M. and Salamini, F. (1991) An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldolase reductase related protein. *EMBO* 10: 1037-1043.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* &: 1515-1525
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299
- De Luca, V., Marineau, c. and Brisson, N. (1989) Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: Comparison with animal dopa decarboxylases. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2582-2586
- Glisin, V., Crkvenjakov, R. and Byus, C. (1974) Ribonucleic Acid Isolated by cesium chloride Centrifugation. *Biochemistry* 13: 2633-2637
- Hedrick, S.M., Cohen, D.I., Nielsen, E.A. and Davis, M.M. (1984) Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane associated proteins. *Nature* 308: 149-153
- Herdenberger, F., Evrard, J., Kuntz, M., Tessier, L., Klein, A., Steinmetz, A. and Pillay, D.T.N. (1990) Isolation of Flower Specific cDNA Clones From Sunflower. *Plant Science* 69: 111-122
- Kim, S.W., K.H. Jung, S.S. Kwak, H.S. Choi, C.Y. Cha and J.R. Liu (1991) Selection of protoplasts-derived cell lines for high yields of indole alkaloids from suspension cultures of vinca (*Catharanthus roseus*). *Korean J, Biotechnol. Bioeng.* 6 : 1-7.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., Eds. (1989) *Molecular Cloning ; A Laboratory Manual*, 2nd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- McKningt, T.D, Bergey, D.R., Burnett, R.J. and Nessler, C.L. (1991) Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants. *Planta* 185: 148-152
- McKnight, T.D., Roessner, C.A., Devagupta, R., Scott, A.I. and Nessler, C.L. (1990) Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein

- strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*. *Nucl. Acids Res.* 18: 4939
- Sargent, T.D. and Dawid, I.B. (1983) Differential Gene Expression in the Gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* 222: 135-139
- Strom, M., Krisinger, J. and DeLuca, H.F. (1991) Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim. Biophys. Acta* 1090: 299-304
- Takahashi, Y., Kuroda, H., Tanaka, T., Machida, Y., Takebe, I. and Nagata, T. (1989) Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from G0-S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9279-9283
- Zimmermann, C.R., Orr, W.C., Leclerc, R.F., Barnard, E.C. and Timberlake, W.E. (1980) Molecular Cloning and Selection of Genes Regulated in *Aspergillus* Development. *Cell* 21: 709-715

제 2 절 일일초 약 (Anther)유래 칼러스로부터 식물체 재분화

1. 서론

체세포 배발생 경로를 통한 식물체의 재분화 기작은 우수한 형질을 가지고 있는 기존 품종을 유전적으로 안정하게 대량 증식시키는 물론 새로운 유용 유전자의 도입을 통한 신품종 개발에 효과적으로 이용될 수 있다. 이러한 체세포 배발생을 통한 식물체 재분화 연구는 쌍자엽 식물은 물론 (Chen et al., 1985), 밀(Heyser et al., 1985), 옥수수(Armstrong and Green, 1985) 등 단자엽 식물에서도 가능함이 보고되고 있으며 최근에는 체세포 배발생 기작을 생화학적, 분자생물학적 수준에서 밝히고자 많은 연구가 수행되고 있다. 쌍자엽 식물에 속하는 일일초는 항암제로 이용되는 indole alkaloid를 생산한다. 이로 인해 일일초에 관한 연구는 2차 대사산물의 생산성 향상 즉, indole alkaloid의 생합성에 관련된 생화학적 기작 규명, 최적 배양 조건의 규명 그리고 고생산성 세포주의 선발이나 생산성의 안정적인 유지등 주로 indole alkaloid의 생산성과 직접적으로 관련된 연구가 수행되어 왔다. 한편 식물세포의 가장 근본적인 특성인 전형성을 입증하는 연구로서 일일초 하배축 유래 칼러스로부터 기관발생을 통한 식물체 재분화가 가능함이 보고된 바 있지만 그 효율은 매우 낮았다 (Constabel et al., 1982). 이러한 측면에서 재분화능이 높은 배발생 세포주의 선발은 일일초 배양세포로부터 전형성의 입증은 물론 유전적인 변이를 최소화하면서 유용한 형질을 안정적으로 유지할 수 있는 수단을 제공할 것이며 더 나아가 이들 세포주를 이용한 형질전환 가능성도 높아질 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 일일초의 약유래 칼러스로부터 체세포 배발생 경로를 통한 식물체 재분화 가능성을 조직학적 관찰을 통해 입증하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 캘러스 유도 및 식물체 재분화

개화 3-7일 전의 일일초 (*Catharanthus roseus* cv Little Delicata)의 약을 취하여 10% 락스로 10분간 표면살균 후 멸균 증류수로 3회 세척한 다음 NAA 1 mg/l, Kinetin 0.1 mg/l 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고체배지 (MSNK)에 치상하여 25 °C 항온기 내에서 암배양 및 광배양 (16/8 hr)을 병행하였다. 유도된 캘러스로부터 식물체를 재분화시키기 위해 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지로 이식하여 25 °C에서 광배양하였다.

2.2. 염색체 분석

약유래 캘러스로부터 재분화된 식물체의 염색체 수를 조사하기 위해 재분화된 40개의 식물체중 10개체를 임의로 선별한 후 뿌리 선단 1 cm 부위를 절단하여 8-HQ 용액에 4시간 30분간 침적시킨 후 증류수로 세척한 다음 EtOH 와 Acetic acid 가 3:1로 혼합된 용액에 뿌리 선단을 넣어 4 °C에서 30분에서 1시간 incubation 하였다. 뿌리 선단을 증류수로 세척한 후 1N HCl로 3-5분간 처리한 다음 acetocarmine 으로 염색하여 현미경 하에서 관찰하였다 (X 1000).

2.3. 체세포배의 조직학적 관찰

체세포배를 FAA (formalin : acetic acid : et-OH = 5 : 5 : 90) 용액에 1일간 고정한 후 30분 간격으로 20% 부터 TBA (tertiary butyl alcohol) 시리즈로 탈수하여 paraplast에 embedding 하였다. Microtome 으로 10 μ m 두께의 조직 절편으로 자른 후 Delafields hema toxylin 으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

2.4. 현탁배양 및 배발생 세포주 선발

유도된 캘러스로부터 현탁배양을 개시하기 위해 캘러스 1g 을 MSNK 액체배지 50 ml 에 넣고 250 ml Erlenmeyer flask 에서 현탁배양을 개시하였다. 배양초기 현탁배양 세포는 세포의 크기가 매우 상이한 세포로 구성되어 있었다. 따라서 현탁배양 세포로부터 배발생 세포주만을 선발하기 위하여 현탁배양 세포를 MSNK 고체배지, 2,4-D가 1 mg/l 첨가된 고체배지 (MSID) 그리고 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지 (MSBM)에 각각 재차 plating 하여 25 °C 암소에서 배양하였다.

2.5. 현탁배양 세포로부터 원형질체 분리 및 배양

계대배양 후 5일 경과된 현탁배양세포를 수거하여 배양세포 1g을 cellulase R-10 2%, macerozyme R-10 0.5%, 3 mM MES 그리고 mannitol 이 9% 첨가된 CPW solution 10 ml 에 넣고 25 °C 에서 30 rpm 으로 5시간 shaking incubation 하였다. 분리된 원형질체는 20 µm sieve 로 걸러낸 후 CPW 9M 용액으로 2 회 세척한 다음 배양배지에 재차 현탁하여 배양 밀도를 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 으로 조정하여 25 °C 암소에서 배양하였다.

3. 결과

3.1 캘러스 유도 및 식물체 재분화

개화 3-7일 전의 약을 표면 살균후 캘러스 유도배지인 MSNK 배지에 치상하여 25 °C 항온기에서 광배양과 암배양을 실시한 결과 약 배양 1주후 부터 anther wall로부터 백색의 캘러스가 유도되기 시작하였다. 광조건하에서 4 주 배양 후 동일 조성의 고체 배지에 재차 계대배양하는 과정에서 plating한 총 24개의 약중에서 1개의 약으로부터 캘러스의 greening 후 체세포배가 유

도되었다(Fig 1, A-B). 그러나 암배양한 24개의 약에서는 백색의 캘러스만이 유도되었으며 체세포배는 유도되지 않았다. 이후 체세포배가 유도된 캘러스 일부를 생장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지로 이식하여 광배양한 결과 캘러스 당 3-5개의 plantlet가 발달하였다(Fig. 1,C). 재분화된 plantlet로부터 재차 캘러스를 유도하기 위해 동일 조건하에서 배양한 결과 shoot의 일부가 캘러스화 되면서 shoot 조직으로부터 직접적으로 부정배가 발생됨을 관찰하였으며 이의 효율은 캘러스로부터 shoot 발생 효율보다 높았다(Fig. 1,D).

3.2 염색체 분석

약 유래 캘러스로부터 재분화된 식물체의 기원을 조사하기 위하여 재분화된 식물체의 뿌리 선단의 염색체 수를 조사한 결과 10개 식물체 모두 반수체 ($n=8$)가 아닌 정상적인 이배체 ($2n=16$)상태의 염색체를 갖고 있었다. 그리고 염색체 분석을 위해 MS 기본배지로 이식하여 배양중인 40개 식물체 모두 정상적인 식물체로 성장하였으며 albino 개체는 발견되지 않았고 개화도 이루어졌다(Fig. 2,E).

3.3 현탁배양 및 배발생 세포주 선발

약 유래 캘러스 1g 을 동일조성의 액체배지 (MSNK) 50 ml 에 넣고 25 100 rpm 으로 현탁배양을 개시하였다. 현탁배양 초기의 배양세포는 비배발생 세포주로 추정되는 세포군(세포의 크기 40-50 μ m)과 배발생 세포주로 되는 추정되는 세포군(세포의 크기 약 10 μ m)이 서로 섞여 있는 이질적인 세포군이였다. 따라서 배발생 세포주만을 재차 선발하기 위하여 현탁배양세포를 MSNK 고체배지와 2.4-D가 1 mg/l 첨가된 고체배지 그리고 MS 기본 배지에 재차 plating 하여 25 °C 암소에서 4주간 배양한 결과 연황색의 배발생

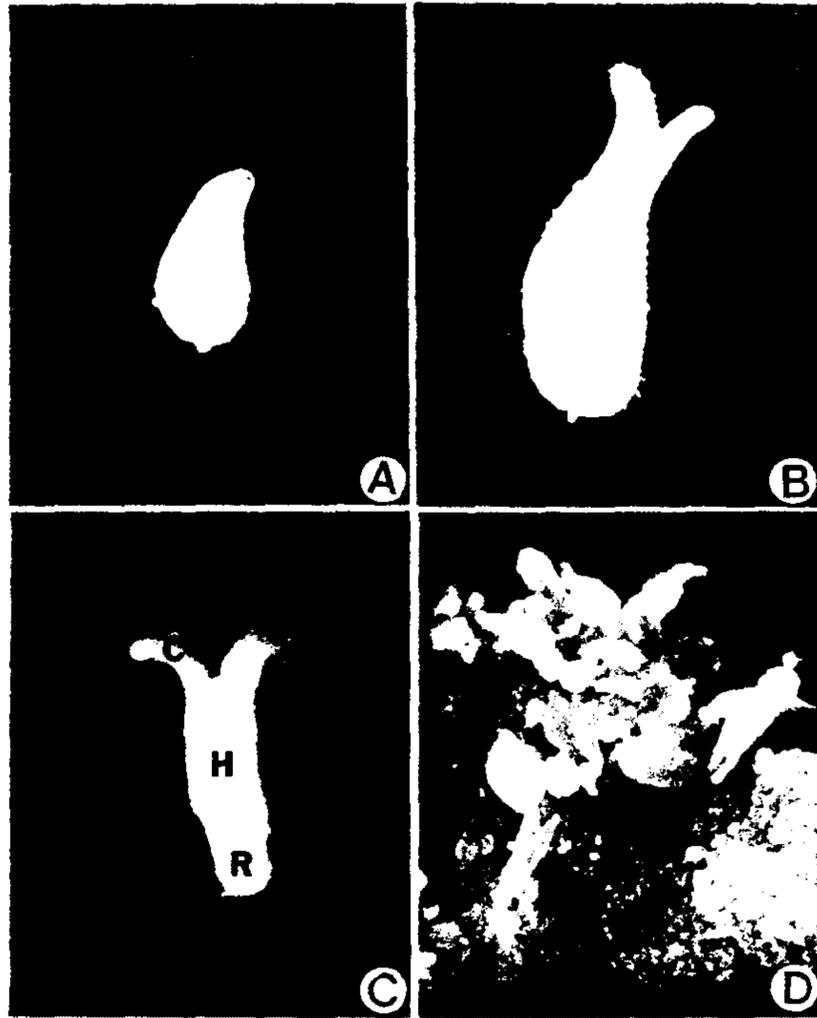


Figure 1. Different stages of development of somatic embryos (0.2-0.5 cm) on MS medium supplemented with 1mg/L NAA and 0.1 mg/L kinetin in the light condition. A: early stage of somatic embryo; B: cotyledonary stage; C: regenerated plantlet(C: cotyledon, H: hypocotyl, R: root); D: production of secondary somatic embryos on the surface of primary somatic embryo.

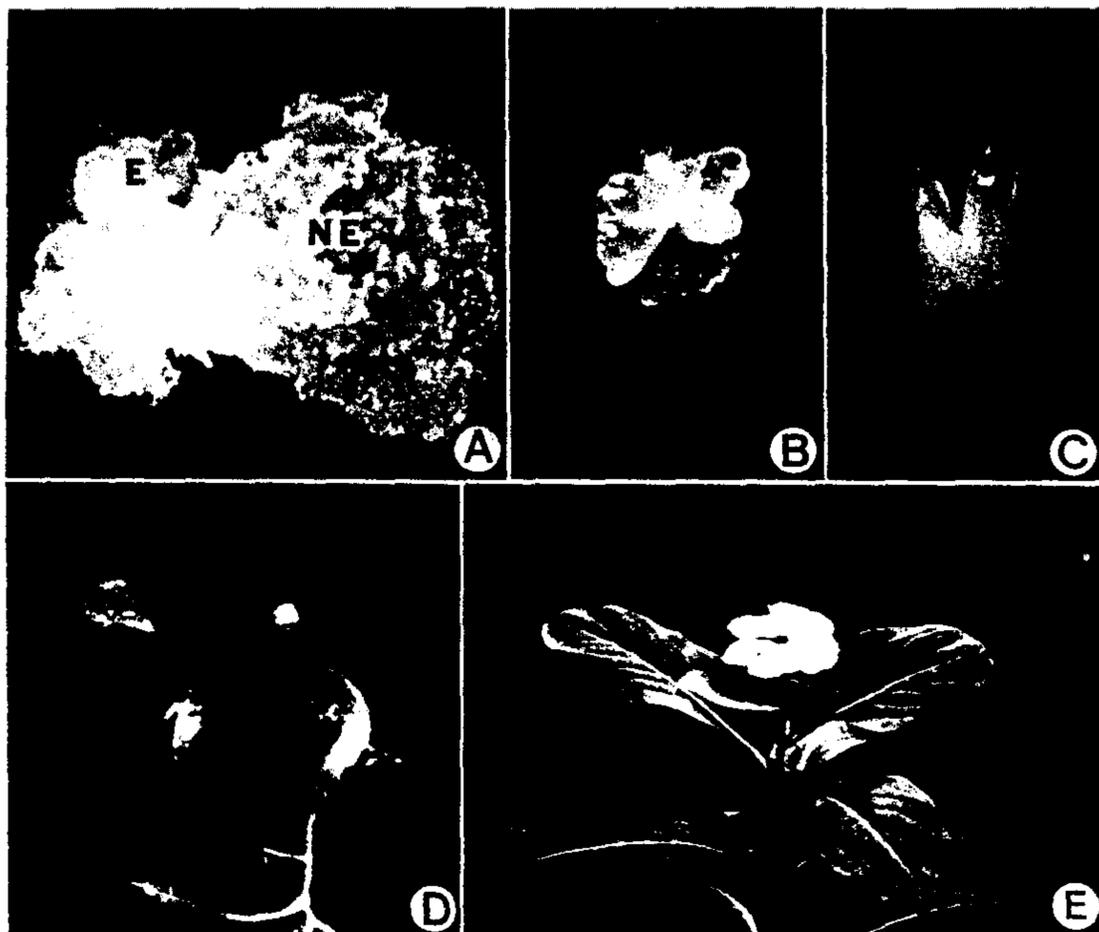


Figure 2. Plant regeneration from anther derived callus of *C. roseus*. A: anther derived callus cultured on MS medium with 1 mg/L 2,4-D; B: multiple aggregates resembling proembryonic structures formed on the surface of embryogenic callus; C: cotyledonary stage; D: regenerated plantlet; E: a flowering plant regenerated from somatic embryo.

캘러스와 백색의 비배발생 캘러스를 육안 식별할 수 있었다(Fig. 2,A). 한편 2,4-D가 1 mg/l 첨가된 MS 고체배지상에서 선발된 배발생 세포주로부터 크기가 약 2 mm 정도의 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스를 성장조절제가 첨가되지 않은 MSBM 액체 배지와 고체배지로 이식하여 4주간 배양하였으나 체세포배의 발달은 관찰할 수 없었다. 그러나 광배양한 캘러스에서는 10개의 캘러스 중 1개의 캘러스에서 배양 2주후 shoot의 분화 및 체세포배의 발달을 관찰할 수 있었다.

3.4. 원형질체 분리 및 배양

배양개시후 약 7일후부터 1차세포분열이 이루어졌으며 배양 2주후 2차세포분열을 관찰할 수 있었다. 약 4주 배양후 세포괴의 발달을 관찰할 수 있었으나 그 이후 계속적인 분열을 통한 체세포배의 관찰은 볼 수 없었으며 오히려 세포괴의 퇴화가 이루어졌다. 비배발생세포주로부터 유리된 원형질체는 배발생세포주 유래 원형질체보다 크며 세포분열은 1차분열만 이루어지고 이후 세포분열은 이루어지지 않았다(Fig. 3).

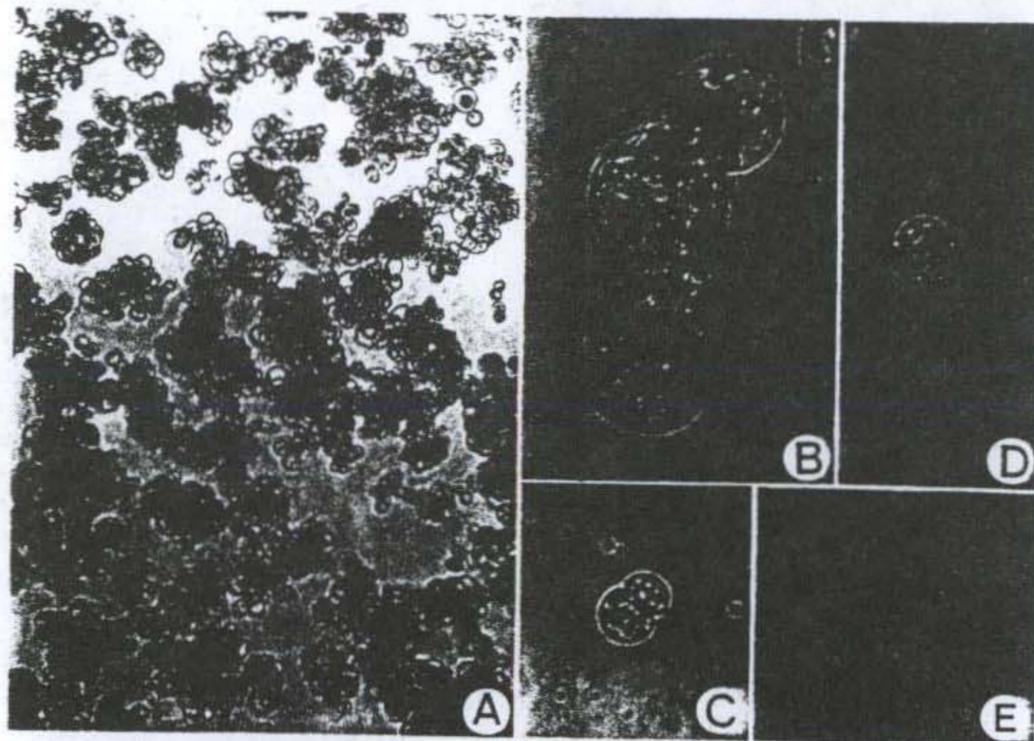


Figure 3. Protoplast culture of anther derived callus. A: embryogenic cell suspension culture (X 100); B: first division of cell derived from nonembryogenic callus(X 400); C: first division of cell derived from embryogenic suspension cells after 1 week in culture(X 400); D: second division after 2 weeks in culture(X 400); E: cell colony derived from protoplast after 4 weeks in culture(X 100).

4. 고찰

본 연구에서는 일일초 약유래 캘러스로부터 체세포배발생 경로를 통한 식물체 재분화가 이루어짐을 조직학적 관찰을 통해 입증하였다. 체세포배 발생 기작은 단일세포로부터 완전한 식물체로 재분화되므로 식물세포의 근본적인 특성인 전형성능의 입증은 물론 식물의 발달과정을 이해하는데 매우 유용한 수단으로 이용되고 있다.

체세포배발달 과정에 있어서 광의 기능은 체세포배의 발달을 억제하며, 비정상적인 체세포배발달을 유도한다(Ammirato, 1970). 그러나 본 실험의 경우 초기 체세포배유도는 광배양 조건에서 시작되었으며 이후 유도된 배발생 캘러스로부터 재분화를 시도한 결과 암배양보다는 광조건에서 더 많은 재분화개체가 유도되었다. 그러나 광배양을 통해 얻어진 배발생 세포주를 암배양하게 되면 광배양시 보다 유도되는 체세포배의 양은 적지만 체세포배의 모양은 광배양시의 비정상적인 모양(Fig. 1)에 비해 정상적인 모양(Fig. 2)으로 발달하였다. 그러므로 체세포배발달 과정에 있어서 비록 광의 기능이 비정상적인 체세포배발달의 원인이 된다 할지라도 체세포배발달의 초기단계에서는 촉진적 기능을 할 것으로 사료된다.

일일초의 약유래 캘러스로부터 재분화된 40개체는 정상식물체로 성장하였으며 개화도 가능하였다. 그러나 재분화된 식물체의 뿌리선단으로부터 염색체수를 조사하기 위해 40개 식물체중 조사된 10개 식물체 모두가 반수체($n=8$)가 아닌 정상의 염색체($2n=16$)를 보유하고 있었다. 따라서 약유래캘러스는 anther wall 등 체세포조직으로부터 기원되었을 가능성과 약배양 과정에서 성장조절제나 다른 epigenetic factor에 의해 핵내재복제(endo reduplication)나 핵내 체세포분열 (endomitosis) 기작에 의해 염색체 배가가 이루어졌을 가능성이 있다. 약유래 캘러스로부터 배발생세포주의 선발 및 현탁배양을 확

립하기 위해 일일초 약유래 캘러스로부터 현탁배양을 개시한 결과 초기 현탁배양 세포는 세포의 형태가 매우 이질적인 세포주이었다. 따라서 이를 세포로부터 세포의 크기가 10 μm 정도인 배발생세포주만을 선별하기 위해 현탁배양세포를 동일조성의 고체배지에 plating하여 배발생세포주를 재차 선별하였다.

2차대사산물의 생산성을 높이기 위한 분자생물학적 접근도 활발히 진행되고있다. 그 예로서 scopolamine 생합성의 전구체인 hyoscyamine으로부터 scopolamine 으로의 전환에 관여 하는 주요효소인 hyoscyamine 6 hydroxylase를 cloning하여 Ti plasmid vector를 이용해 도입함으로써 scopolamine 생합성을 증가시키는 연구가 진행되고 있다(Hashimoto et al., 1990). 그러나 일일초에서는 아직까지 형질전환에 관한 성공적인 보고는 없다. 따라서 재분화능이 높은 배발생세포주를 이용한다면 tryptophan decarboxylase나 strictosidine synthase등 indole alkaloid 생합성의 주요효소들을 Ti plasmid vector를 통한 도입 가능성도 높아질 것이며 더 나아가 형질전환된 일일초의 생산도 가능할 것이다. 그리고 이에따른 indole alkaloid의 생산성도 더욱 높아질 것으로 기대된다.

5. 참고문헌

- Ammirato PV, Steward FC 1971 Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cell. Bot. Gaz. 132: 149-158.
- Armstrong CL, Green CE (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-tryptophan. Planta 164: 207-214.
- Chen TH, Lam L, Chen SC (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice). Plant Cell and Organ Culture 4: 51-54.
- Constabel F, Gaudet-La Prairie P, Kurz KGW, Kutney JP. (1982) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. Plant Cell Reports 1: 139-142.
- Hashimoto T, Matsuda J, Okabe S, Amano Y, Yun DJ, Hayashi A, Yamada Y. Molecular cloning and tissue and cell specific expression of hyoscyamine 6 β -hydroxylase. In: Nijkamp HJJ, Vanderplas LHW, Yanaartrijk J (ed) Progress in Plant cellular and molecular biology, Vol 9775-780. Kluwer Academic publishers (1990)
- Heyser JW, Nabors MW, Mackinnon C, Dykes TA, Demott KJ, Kantzman DC, Mujeeb-kazi (1985) Long-term high frequency plant regeneration and the induction somatic embryogenesis in callus cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) Z. Pflanzenzuchtg 94: 218-233
- Murashige T, Skoog F(1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Planta 15: 473-497
- Nomura K, Komamine A (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. Plant physiol. 79: 988-991
- Wenzel G, Foroughi-wehr B Anther culture of cereals and Grasses In: Vasil, IK (ed) cell culture and somatic cell genetics of plants vol 1 Laboratory procedures and application 311-327. Academic press. Inc (1984)

여 백

제 5 장 부록 (본 과제와 관련한 특허 및 국내외 학술지 게재논문목록)

1. 특허 ;

고압고밀도 상태의 이산화탄소 용매에 의한 일일초로부터 인돌알카로이드류의 추출방법, 국내특허 출원중 (1991년).

2. 학술지 게재논문 ;

(1) 김석원, 정경희, 곽상수, 최현섭, 최차용, 유장렬 (1991)
일일초(*Catharanthus roseus*) 현탕배양으로부터 원형질체유래 indole alkaloid 고생산성 세포주 선발. 한국생물공학회지 제6권 제1호 1-7.

(2) 정경희, 곽상수, 김석원, 최차용, 유장렬 (1991)
일일초(*Catharanthus roseus*) 현탕배양에서 배지농도 및 세포접종량의 적정화에 의한 indole alkaloid생산성 향상. 식물조직배양학회지 제18권 제4호 263-269.

(3) 송규민, 박상우, 이 혼, 홍원희, 곽상수, 유장렬 (1991)
초임계 이산화탄소와 에탄올을 이용한 일일초로부터 인돌 알카로이드의 추출에 관한 연구. 한국생물공학회지 제6권 제4호 407-412.

(4) H. Lee, W.H. Hong, J.H. Yoon, K.M. Song, S.S. Kwak and J.R. Liu (1992)
Extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by using supercritical carbon dioxide. *Biotechnology Techniques*. 6(2) : 127-130.

(5) K.H. Jung, S.S. Kwak, S.W. Kim, C.Y. Choi, G.S. Heo and J.R. Liu (1992)
Selection of protoclones for high yields of indole alkaloids from suspension cultures of *Catharanthus roseus* and the qualitative analysis of the compounds by LC-MS. *Biotechnology Techniques*. 6(4) : 305-308.

- (6) K.H. Jung, S.S. Kwak, S.W. Kim, H. Lee, C.Y. Choi, and J.R. Liu (1992)
Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. *Biotechnology Letters*. (in press)
- (7) K.M. Song, S.W. Park, W.H. Hong, H. Lee, S.S. Kwak and J.R. Liu (1992)
Isolation of vindoline from *Catharanthus roseus* by supercritical fluid extraction. *Biotechnology Progress* (in press).
- (8) 정경희, 곽상수, 김석원, 최차용, 유장렬 (1992)
일일초 (*Catharanthus roseus*) 모상근배양에서 배지적정화에 의한 catharanthine 생산성 향상. 식물조직배양학회지(인쇄중)
- (9) 박상우, 이 혼, 곽상수, 정경희, 유장렬 (1992)
초임계유체추출에 의한 vindoline과 일일초모상근배양에 의한 catharanthine의 화학결합을 통한 vinblastine의 생산. 한국생물공학회지 (투고중)
- (10) S.W. Kim, K.H. Jung, S.S. Kwak, and J.R. Liu.
Relationship between morphology and yields of indole alkaloids in suspension cultured cells of vinca (*Catharanthus roseus*). (in preparation).
- (11) 김석원, 정경희, 곽상수, 송남희, 유장렬
일일초약유래 캘러스로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재분화.(준비중)

3. 기타

- (1) 유장렬, 곽상수, 정경희 (1991)
일일초(*Catharanthus roseus*)세포배양에 의한 indole alkaloid생산. Proceedings of The 5th Symposium on Plant Biotechnology - Progress in Plant Cell and Tissue Culture - p. 123-151.

(2) J.R. Liu, S.S. Kwak and K.H. Jung (1991)

Empirical and rational approaches for improving yields of secondary metabolites in plant cell cultures. Proceedings of Internatinal Symposium on Genetic Engineering in Commemoration of the 40th Anniversary of ChungBuk national University. p. 29-45.

(3) 유장렬, 곽상수, 정경희 (1992)

식물세포배양에 의한 유용이차대사산물 생산 : 상류적 고찰. 생물공정연구의 최근동향 (생물공정연구센터). p.138-148.