

일일초 (*Catharanthus roseus*) 현탁배양으로부터
원형질체유래 Indole Alkaloid 고생산성 세포주 선발

김 석 원 · *정 경 희 · *곽 상 수 · **최 현 섭 · ***최 차 용 · *유 장 렬
*한국과학기술연구원 유전공학연구소 식물세포생물학연구실
경희대학교 분리과대학 생물학과, *서울대학교 공과대학 공업화학과

Selection of Protoplasts-Derived Cell Lines for High Yields Indole Alkaloids from Suspension Cultures of Vinca (*Catharanthus roseus*)

Suk W. Kim***, Kyung H. Jung****, Sang S. Kwak*, Hyun S. Choi**, Cha Y. Choi***
and Jang R. Liu*

*Plant Cell Biology Lab., Genetic Engineering Research Institute, KIST,
P. O. Box 17, Taedok Science Town, Taejon, 305-606, Korea

**Department of Biology, Kyunghee University

***Department of Chemical Technology, Seoul National University

ABSTRACT

To produce economically important indole alkaloids by cell cultures, we selected protoplasts-derived clones (protoplasts) of vinca (*Catharanthus roseus*) for high yields of catharanthine and ajmalicine. Protoplasts were enzymatically isolated from suspension-cultured cells. The highest plating efficiency (1%) was obtained when protoplasts were plated at a density of 1×10^5 protoplasts/ml in a culture medium solidified with 0.4% Seaplaque agarose. The growth rates of 40 protoplasts subcultured on a solid medium varied over a wide range. Protoplast VPC-6, which had the highest growth rate, was observed to produce relatively high yields of catharanthine and ajmalicine when cultured in a liquid medium. Although the original cell line did not produce catharanthine at a detectable level by HPLC, protoplast VPC-10 produced it at a level of $5.9 \mu\text{g/g}$ fresh weight of cells for 10 days of culture. Under the same conditions, protoplast VPC-15 produced ajmalicine at a level of $133.6 \mu\text{g/g}$, of which productivity was improved about 3 times than that of the original cell line. The results indicate that differences in the growth rate and indole alkaloid yield among the protoplasts reflect the somaclonal variation in suspension-cultured cells.

서 론

협죽도과 식물인 일일초(*Catharanthus roseus*)가 생산하는 ajmalicine, vinblastine, vincristine 등의 indole alkaloid

는 혈압강하, 항암작용 등의 약리적 가치가 높은 이차대사산물이다. 특히 이량체 indole alkaloid인 vinblastine과 vincristine은 그림당 미화 5,000불에 상당하는 고가 의약품으로 세계시장규모는 연간 5-7.5억불에 달하고 있

다. 식물체중의 이들의 함량은 극미량(수 ppm정도)이어서 식물체로부터 직접 대량추출하기에는 비용이 많이 들며 복잡한 화학구조를 하고 있으므로 화학합성적인 방법으로 대량생산하기에도 어려움이 있다. 따라서 식물 조직배양에 의한 일일초의 유용 indole alkaloid 생산에 관한 연구가 오랫동안 수행되어져 왔다(1,2,3).

Vinblastine와 vincristine의 생산을 위한 합리적인 방법은 일차적으로 이들의 전구물질인 catharanthine과 vindoline을 대량생산하는 시스템을 확립한 후, 이들 전구물질로부터 효소학적인 반응으로 이량체 indole alkaloid를 생산하는 것이다(4,5,6). 전구물질 중에서 vindoline의 식물체중의 함량은 건물중의 0.12%로 비교적 높아 분리공정의 최적화로 필요한 양을 확보할 수 있을 것이나 catharanthine의 함량은 0.003%로 매우 낮으므로 세포 배양에 의한 catharanthine 생산세포주를 선발하는 방법을 택하고 있다. 주로 세포괴를 분할하여 고생산성 세포주를 선발하고 있는데 현탁배양된 단세포나 수개의 세포로 구성된 세포군(cell aggregate)을 유리하여 catharanthine을 식물체내의 함량보다 3배 이상 생산할 수 있는 세포주를 개발할 수 있다(7). 그러나 이러한 방법은 오랜기간이 소요되거나 기술상의 번거로움 때문에 효율적인 세포주 선발법이 되지 못한다.

관련 자초의 경우 원형질체 유래 세포주로부터 shikonin 생산성이 기존 세포주보다 향상된 세포주를 단시일에 비교적 용이하게 선발할 수 있다(8). 따라서 본 연구에서는 이량체 indole alkaloid의 중요 전구물질인 catharanthine의 생산체계를 확립하기 위하여 일일초 현탁배양세포로부터 원형질체를 유리, 배양하여 얻은 protoclone으로부터 indole alkaloid 고생산성 세포주를 선발하고자 한다.

재료 및 방법

캘러스 유도 및 현탁배양

일일초(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don: cv. Little Delicata)의 무균발아한 유식물체의 하배축을 1cm씩 잘라서 2.0mg/l p-CPA(p-chlorophenoxyacetic acid), 0.5mg/l 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 0.1mg/l kinetin을 첨가한 Schenk와 Hildebrandt(SH)(9) 고체 배지에 치상한 후 6주간 배양하여 캘러스를 얻었다. 유도된 캘러스는 동일조성의 SH액체 배지를 첨가한 250ml Erlenmeyer flask에 넣은 후 100 rpm의 항온 shaker에서 현탁배양하였으며 약 10일 간격으로 계대배양하였다. 본 연구에서 특별한 언급이 없는 모든 배양은 25℃의 암소에서 행하였다.

원형질체 유리 및 배양

현탁배양세포로부터 원형질체의 분리 및 배양은 Frearson 등(10)의 방법에 준하였다. 계대배양후 5일 경과된 세포현탁액을 10ml tube에 넣고 100×g로 10분간 원심분리하였다. 총부피가 약 1cm³인 세포들을 수기하여 20ml의 13% mannitol을 첨가한 CPW(10) 용액이 담긴 페트리디쉬(90×15mm)에 분산시켜 1시간동안 진처리하였다. Mannitol용액을 제거한 후 10ml의 효소액으로 수기한 세포를 분산시켰다. 효소액은 2% Cellulase R-10 (Yakult), 0.5% Macerozyme R-10 (Yakult), 3mM MES, 9% mannitol, CPW 무기염으로 조성하였다. 세포와 효소액을 섞은 페트리디쉬는 Parafilm으로 봉한 후 30 rpm의 gyratory shaker위에 놓고 27℃의 암소에서 5시간 동안 배양하였다. 유리된 원형질체를 분리하기 위하여 잔사를 구경 100 μ m의 stainless steel mesh로 걸러낸 후 효소액을 100×g로 3분간 원심분리하여 제거하였으며 가라앉은 원형질체를 9% mannitol에 CPW 무기염을 넣은 용액에 분산시킨 후 원심분리하여 용액을 제거하고 회수하는 과정을 2회 반복함으로써 잔류 효소액이 남지 않도록 하였다. 최종 원심분리는 21% sucrose에 CPW 무기염을 넣은 용액으로 원형질체를 분산시킨 후 행하였다. 남은 잔사는 가라앉히고 원형질체는 용액의 상층에 떠올랐다. 이 원형질체를 피펫으로 수기하여 Murashige와 Skoog(11) 기본배지에 9% mannitol, 2mg/l NAA(1-naphthaleneacetic acid), 0.5mg/l BA(6-benzylaminopurine)를 첨가한 배지(원형질체 배양배지)에 분산시킨 다음 hemacytometer로 ml당 1×10⁴, 5×10⁴, 1×10⁵, 2×10⁵개의 원형질체가 되도록 희석하였다. 이것을 페트리디쉬(60×15mm)에 가능한 얇게 담아서 (thin layer plating method) 배양하면서 24시간마다 위상차 도립 현미경으로 관찰하였다. 그리고 여러 gelling agent가 원형질체 배양에 미치는 효과를 조사하기 위해 각각 0.4%의 Bacto-agar, Sigma agarose (type VII), Seaplaque agarose를 원형질체 배양에 이용하였다. 원형질체 배양 6주후 발달한 microcallus는 SH 고체배지에 옮겨서 배양하였다.

Plating efficiency의 측정

Plating efficiency는 초기 세포분열 단계(배양 3주)와 colony의 육안 식별이 가능한 후기 colony 형성단계(배양 6주)에서 조사하여 다음과 같이 결정하였다.

$$\text{Plating efficiency} (\%) = \frac{\text{육안으로 식별할 수 있는 colony의 수}}{\text{Plating한 원형질체의 총수}} \times 100$$

Protoclone의 생장률 측정

원형질체를 배양하여 얻어진 microcallus (=protoclone)를 mannitol이 없는 SH고체배지로 이식하여 4주간 배양한 후 전체 생중량을 측정함으로써 protoclone간의 초기 생장률을 비교하였다. 또한 1차 계대배양후 각 protoclone으로부터 2-3mm 크기의 캘러스를 절취하여 행한 2차 계대배양에서 페트리디쉬당 4개씩 3개의 반복구로 SH고체 배지에 치상하여 7주간 배양한 후 캘러스의 생중량을 측정하여 protoclone간의 생장률을 비교하였다.

세포배양에 의한 indole alkaloid 생산

원형질체를 배양하여 얻은 microcallus를 SH 액체 배지에서 증식시킨 후 3-5회의 계대배양을 하였다. Indole alkaloid의 생산을 위하여 계대배양후 1주일 경과된 배양 세포를 수거하여 생중량 0.5 g을 기본 무기염 농도를 1/2로 감소시킨 MS배지에 50 g / l sucrose, 1.13mg / l BA, 0.18mg / l IAA (3 indoleacetic acid)를 첨가한 indole alkaloid 생산배지 15ml을 100ml Erlenmeyer flask에 옮겨서 배양하였다. 이때 대조구는 본래의 현탁배양세포(모세포주)를 사용하였다.

Indole alkaloid 추출 및 분석

Indole alkaloid 생산배지에서 10일간 배양하여 세포를 감압여과로 수거한 후 보고된 방법들(12, 13)에 준하여 crude alkaloid extract를 추출하였다. 수거한 배양세포 생중량 1g에 methanol 10ml를 첨가한 후, 40°C 온수에서 10분간 sonication을 시켜서 (이 과정을 3회 반복) 얻어진 methanol 추출액을 감압농축 하였다. 농축액을 1N HCl과 ethyl acetate의 혼합용액(각 20ml)으로 분배한후, 수용액부분을 5N NaOH를 사용하여 pH 10으로 조정하고 수용액과 동량의 ethyl acetate로 3회 추출한 후 감압 농축하여 crude alkaloid extract를 얻었다.

각 protoclone이 생산하는 indole alkaloid는 HPLC를

사용하여 분석하였다. 이때 역상 chromatography인 ODS column (μ -Bondapak C₁₈ column, 30×0.39cm)를 이용하여 표준 indole alkaloid와 비교하여 정량분석을 하였다. 용출액(methanol: acetonitrile: 5 mM diammonium hydrogen phosphate, pH 7.3, 3:4:3)의 유속은 1ml / min였으며 UV 298nm에서 각 화합물을 검출하였다. 본 실험에 이용된 표준 catharanthine은 캐나다 British Columbia 대학의 J. P. Kutney 교수로부터 기증 받았으며, ajmalicine은 Fluka사로부터 구입하여 사용하였다.

결 과

원형질체 배양

원형질체(Fig. 1A)는 배양 3일 후 세포벽 재생과 함께 세포분열이 일어났으며(Fig. 1B), 1주일 경과 후 2차 세포분열이 일어났다(Fig. 1C). 배양 3주 후 colony(Fig. 1D)가 형성되었으며, 6주 후 육안으로 식별할 수 있는 microcallus가 형성되었다(Fig. 1E).

Plating efficiency에 미치는 원형질체 배양 밀도 및 gelling agent의 영향

원형질체의 배양밀도가 세포분열능력에 미치는 영향을 조사한 결과, Sigma agarose (VII)를 gelling agent로 이용하였을 경우에는 ml당 1×10^6 개보다 낮은 배양밀도에서도 세포분열 및 colony 형성이 이루어졌으며 plating efficiency 도 액체배양에 비해 증가하였으나 Bacto-agar를 gelling agent로 이용한 배양에서는 세포분열 및 colony 형성을 관찰 할 수 없었다(Table 1). 그리고 액체배양에서 ml당 2×10^5 개 이상의 높은 배양 밀도에서는 원형질체 사이의 응집현상이 빈번하게 나타났다. 본 실험조건에서 plating efficiency는 원형질체의 밀도를 ml당 1×10^5 개, gelling agent로 Scaplaque agarose를 이용한 경우 1%로 가장 높았다.

Table 1. Plating efficiency of vinca protoplasts in agarose, agar, and liquid culture media

Gelling agent (0.4%)	Plating density (number of protoplasts / ml)			
	1×10^4	5×10^4	1×10^5	2×10^5
Sigma agarose(VII)	0.2	0.3	0.5	—
Scaplaque agarose	—	—	1.0	—
LMT				
Bacto-agar	0	0	0	—
None(liquid)	0	0	0.01	0.01

—: not determined

$$(\%) \text{Plating efficiency} = \frac{\text{number of visible colonies}}{\text{total numbers of plated protoplasts}}$$

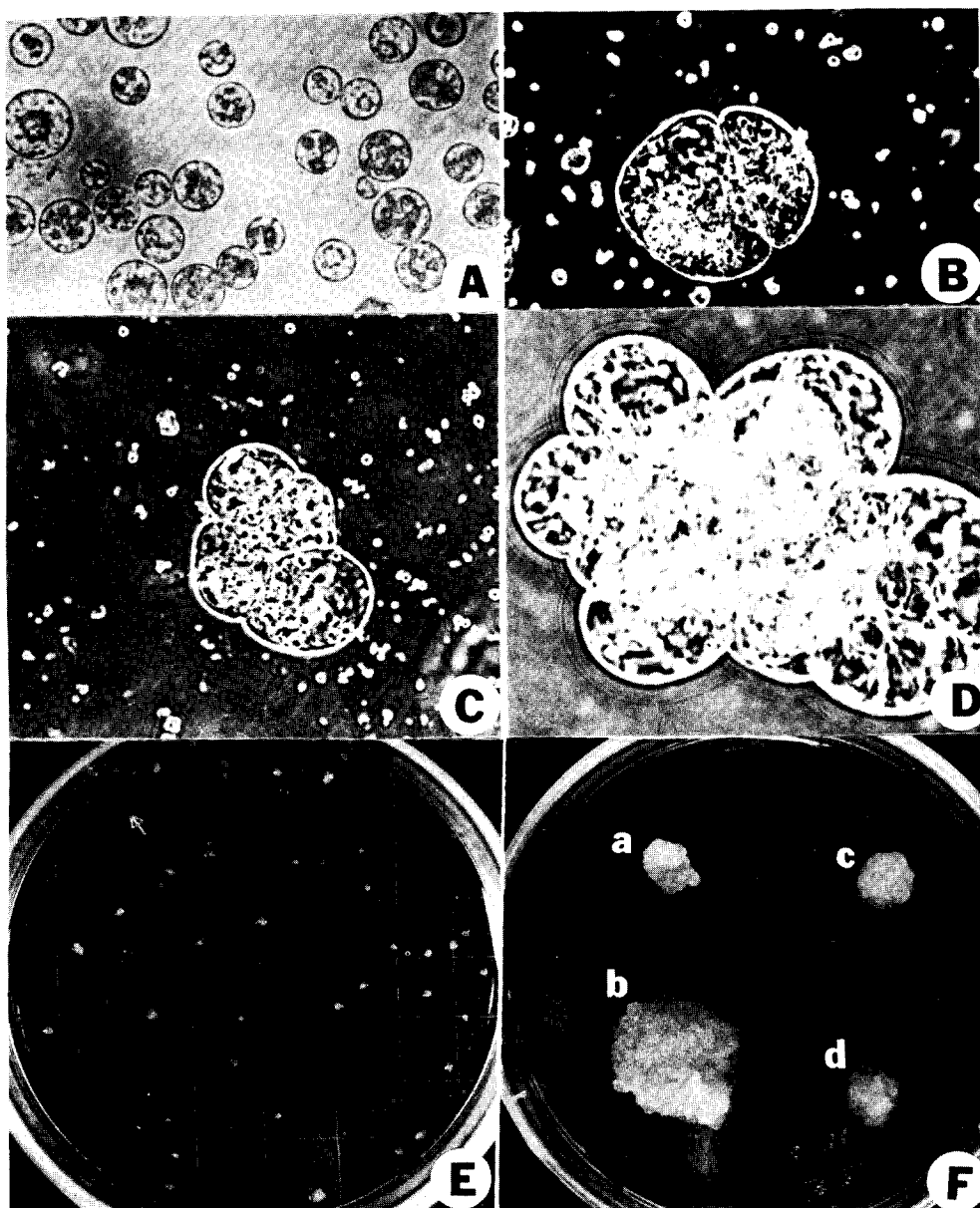


Fig. 1. Callus formation from suspension culture-derived protoplasts of vinca.

A: Freshly isolated protoplasts($\times 100$).

B: First cell division of a protoplast ($\times 400$).

C: Second division of a protoplast ($\times 400$).

D: Colony formation from a protoplast ($\times 400$).

E: Microcalli formation on agarose culture medium.

F: Protoclones subcultured on SH agar medium.

(a, VPC-5; b, VPC-6; c, VPC-7; d, VPC-8)

Protoclone간의 생장률 변이

원형질체 배양을 통해 얻어진 microcallus를 SH 고체배지로 옮겨서 4주간 배양 후 얻어진 40개의 protoclone (Fig. 1F)의 생중량을 측정하였던 바 대부분의 protoclone의 생중량을 50mg 이하의 분포를 보였으며 평균 생중량은 23mg이었다. 이 중에서 VPC-6로 명명된 protoclone은 270mg으로 다른 protoclone에 비해 증식 속도가 대단히 높았다(Fig. 2). 또한 2차 계대배양후의 생중량 분포에 있어서도 VPC-6가 생중량이 700mg으로 가장 높았는데 1차 계대배양 후에 비해 변이폭이 감소하면서 정상적인 이항분포를 나타내었다(Fig. 3).

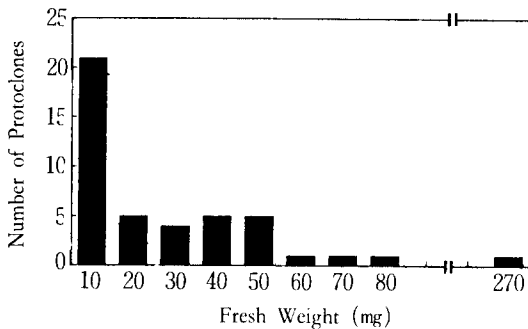


Fig. 2. Distribution of fresh weight of protoclones after 4 weeks of culture on SH agar medium.

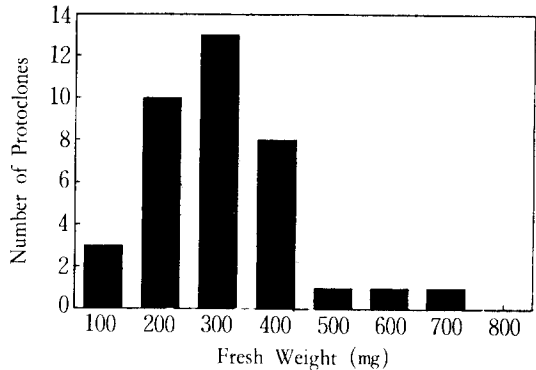


Fig. 3. Distribution of fresh weight of protoclones after 7 weeks of culture on SH agar medium.

Protoclone간의 indole alkaloid 생산성 변이

각 protoclone이 생산배지에서 10일간 배양한 후 생산된 주요 indole alkaloid를 정량분석한 결과 40개의 protoclone 중 20개에서는 indole alkaloid 생산이 이루어지지 않았으며, alkaloid를 생산하는 protoclone중에서도 ajmalicine과 catharanthine 생산량은 각 protoclone마다 매우 큰 차이를 보였다(Table 2). 특히 생장률이 높았던 VPC-6은 다른 protoclone에 비해 ajmalicine과 catharanthine 생산량이 비교적 높았다. Catharanthine의 생산에 있어서는 VPC-10이 세포 생중량 그래프당 5.9 μ g으로 가장 높았으

Table 2. Production of indole alkaloids in cell suspension cultures of 40 protoclones of vinca. After 10 days of culture in the production medium, indole alkaloids were extracted from the cells and analyzed by HPLC

Protoclone VPC-	Fresh weight of cells (g/15 ml medium)	Ajmalicine (μ g/g fresh weight of cells)	Catharanthine (μ g/g fresh weight of cells)	Protoclone VPC-	Fresh weight of cells (g/15 ml medium)	Ajmalicine (μ g/g fresh weight of cells)	Catharanthine (μ g/g fresh weight of cells)
1	1.2	19.0	1.5	15	2.1	133.6	0
4	1.7	33.0	0	16	1.7	77.5	2.2
5	1.0	10.7	0	19	2.5	2.5	0.5
6	2.9	64.9	3.9	22	2.3	43.8	0
7	1.7	34.0	0	25	2.0	78.5	0
8	0.6	5.0	0	26	1.9	0	2.9
9	2.2	12.5	0	32	1.7	46.0	1.8
10	1.9	30.9	5.9	39	1.8	18.1	0
11	2.0	1.0	0	40	1.3	73.5	1.1
13	2.3	10.8	0	The original cell line	2.3	42.2	Trace*
14	1.0	35.5	1.8				

*Trace indicates an undetectable level by HPLC.

며 이는 본래의 현탁배양 세포가 catharanthine을 거의 생산하지 못한 것과 비교할 때 주목할 만한 결과이다. Ajmalicine의 생산에 있어서는 VPC-15에서 133.6 μ g으로 가장 높았는데 이것은 모세포주보다 생산성이 약 3배 향상된 것이다. Catharanthine과 ajmalicine를 생산하는 protoclone에서 vindoline, vinblastine, vincristine 등의 indole alkaloid는 검출되지 않았다. 한편 protoclone의 고체배지에서의 초기 생장률과 액체생산배지에서의 indole alkaloid 생산성 사이에는 상관관계가 나타나지 않았다(자세한 데이터는 제시되지 않았음).

고 찰

본 연구에서는 일일초 현탁배양세포로부터 원형질체를 유리, 배양하여 얻은 protoclone으로부터 indole alkaloid 고생산성 세포주를 선발할 수 있음이 확인되었다. Constabel 등(14)은 일일초의 엽육세포 유래 원형질체 배양시 화학적 조성이 밝혀져 있지 않은 배지(conditioned medium)를 첨가하여 배양함으로써 유전적으로 균일한 세포주를 선발 할 수 있었다. 그러나 본 실험에 이용된 일일초 현탁배양세포 유래 원형질체는 화학적 조성이 밝혀진 배지조건에서 세포분열이 이루어짐으로써 protoclone의 확보가 가능하였다.

원형질체 배양밀도와 gelling agent가 세포분열 및 colony 형성에 미치는 영향을 조사하였던 바 Bacto-agar를 이용하여 원형질체를 배양한 처리구에서는 세포분열이나 colony 형성이 관찰되지 않았으나 Sigma agarose (type VII)를 이용하여 원형질체를 배양한 처리구에서는 배양밀도가 낮은 조건에서도 세포분열이 이루어졌다. 이 결과는 Shillito 등(15)에 의한 agarose plating이나 agarose bead culture가 원형질체의 plating efficiency를 증가시킨다는 보고와 일치한다. 그러나 본 연구에서는 액체배양을 통해 얻어진 protoclone만을 alkaloid 생산분석에 이용하였으므로 추후 agrose bead culture등을 통해 더욱 많은 수의 protoclone을 확보한 다음 이들로부터 고생산성 세포주 선발 가능성도 조사되어야 하겠다. 그리고 선발된 고생산 세포주로부터 원형질체를 재차 유리, 배양하여 얻어지는 subclone에서는 보다 생산성이 높은 세포주의 선발 가능성이 제시된 바 있으므로(16) 본 실험을 통해 선발된 고생산성 세포주에서도 이에 대해 조사중이다.

Protoclone의 초기 생장률은 protoclone마다 커다란 차이를 보였다. 그러나 일정 배양기간이 경과한 후 protoclone의 일부를 동일조성의 SH 고체배지에 이식하여 7주간 암배양 한 결과 생장률의 변이폭이 적어지면서

정상적인 이항분포를 나타냈다. 따라서 protoclone 간의 생장률 변이는 세포자체의 분열능력의 차이와 원형질체 배양배지의 수분 스트레스 조건에서 배양과정동안 습득한 수분 스트레스에 대한 저항성 차이 때문인 것 같다.

40개의 protoclone중 20개에서는 indole alkaloid 생산이 이루어지지 않았다. 그리고 indole alkaloid를 생산하는 protoclone에서도 ajmalicine과 catharanthine의 생산성에 큰 차이를 보였다. 특히 VPC-6, VPC-10, VPC-15에서는 다른 protoclone에 비하여 상대적으로 높은 indole alkaloid 생산이 이루어졌다. 세포피 분할 및 세포균이나 단세포 분리법에 의한 고생산성 세포주 선발에는 장시간이 소요되거나 효율이 낮다. 그러나 protoclone을 사용함으로써 모세포주에서는 HPLC에서 측정되지 않을 정도의 낮은 catharanthine의 생산성을 나타 내었으나 VPC-6와 VPC-10의 경우와 같이 상당한 정도의 생산성을 가진 세포주를 비교적 용이하게 선발할 수 있었다. 또한 VPC-15의 경우는 모세포주보다 약 3배의 ajmalicine 생산성을 가지고 있었다. Catharanthine의 경우 VPC-10의 10일 배양후의 생산량은 건물중비로는 식물체로부터 추출되는 정도이나 이의 생산성은 배지조성과 배양조건의 개선에 따라 훨씬더 증가될 수 있을 것으로 생각된다.

한편 이량체 indole alkaloid로서 부가가치가 높은 vinblastine과 vincristine은 식물체내에 존재량이 극미량(수 ppm)일 뿐만아니라 세포배양을 통한 고생산성 세포주의 선발에 관한 보고가 거의 없는 상태이다. 따라서 vinblastine과 vincristine을 효율적으로 생산하는 수단으로서 이들 주요 전구체인 catharanthine과 vindoline을 효소학적으로 결합시켜 생산하는 방법이 활발히 연구되고 있다(4,5,6). Vinblastine과 vincristine을 효소학적 결합을 이용하여 대량생산하기 위해서는 vindoline과 catharanthine의 대량생산이 선결되어야 한다. Vindoline은 식물체의 잎에서 비교적 다량 생산되므로 식물체로부터 비교적 쉽게 충분한 양을 추출할 수 있으리라 기대된다. 그러나 catharanthine의 경우는 식물체내의 함량이 매우 낮으므로 catharanthine은 배양세포로부터 고생산성 세포주를 선발하여 대량생산하는 방법을 택할 수 있다. 이러한 측면에서 볼 때 본 연구에서 선발된 VPC-10은 비교적 많은 양의 catharanthine을 생산하고 있으므로 vinblastine과 vincristine의 효율적인 생산에 이용될 수 있을 것이다.

Protoclone 간의 생장률, alkaloid 생산량(17), 생산되는 alkaloid의 종류(15)의 차이가 나타나는 것은 배양과정중에서 일어나는 체세포변이의 결과로 생각된다. 본 실험에서는 이러한 점을 이용하여 현탁배양세포 유래 원형질체로부터 indole alkaloid 생산성이 높은 세포주를 선발할

수 있었다. 본 실험에서 얻어진 VPC-6, VPC-10과 같이 다른 protoclone에 비하여 상대적으로 ajmalicine과 catharanthine 생산성이 높으며 생장률이 높은 세포주를 이용하여 모세포주보다 indole alkaloid 생산성이 높은 subclone을 재차 선발함으로써 보다 안정성이 있는 고생산성 세포주의 선발이 가능할 것으로 기대된다. 그리고 선발된 세포주의 indole alkaloid 생합성에 관련된 rate-limiting enzyme 이나 regulatory gene을 cloning하여 고생산성 세포주에 도입하는 등 여러 분자생물학적인 기술을 이용함으로써 indole alkaloid 고생산성의 안정적인 유지 및 생산성의 증가가 가능할 것으로 사료된다(18).

요 약

일일초의 중요 indole alkaloid를 세포배양 시스템을 이용하여 대량 생산하기 위하여 현탁배양세포에서 유리한 원형질체를 유리, 배양하여 indole alkaloid 고생산성 세포주를 선발하였다. 현탁배양세포를 효소처리하여 원형질체를 유리하였으며, 배양 3일 후부터 세포분열이 이루어지면서 배양 6주 후에는 microcallus를 형성하였다. 원형질체의 plating efficiency는 1ml당 1×10^5 개의 원형질체를 0.4% Seaplique agarose로 고형화한 배지에 plate 하였을 때 1%로 가장 높았다. Protoclone간의 고체배지에서의 초기 생장률의 차이는 심하게 나타났으며 40개 protoclone 중에서 VPC-6는 평균치보다 10배 이상의 높은 생장률을 보였다. VPC-6는 비교적 많은 ajmalicine과 catharanthine을 액체배지에서 생산하였다. 그리고 10일간 배양한 VPC-10과 VPC-15에서 catharanthine (5.9 μ g/g 생중량)과 ajmalicine(133.6 μ g/g 생중량)이 각각 가장 많이 생산되었다. 모세포주는 catharanthine을 생산하지 않았으며 VPC-15는 모세포주보다 ajmalicine 생산성에 있어서 약 3배 향상된 것이다. Protoclone간의 초기생장률과 indole alkaloid 생산성의 차이는 현탁배양세포의 체세포변이를 반영하는 것으로 사료된다.

감 사

본 논문은 과학기술처 첨단연구개발과제의 연구결과(BSN70901-215-4)이다. 표준 indole alkaloid를 기증한 J. P. Kutney박사와 원고에 대해 세심한 논평과 수정을 가해준 박영훈, 백경희, 송남희 박사에게 감사한다.

참 고 문 헌

1. A. J. Parr (1989), *J. Biotech.*, **10**, 1.

2. M. Lounasmae and J. Galambos (1989), *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **55**, 89.
3. V. Deluca and W. G. W. Kurz (1988), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*, Academic Press, Vol. 5, 385.
4. Y. Fujita, Y. Hara, T. Morimoto and M. Misawa (1990), *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 783.
5. T. Endo, A. Goodbody, J. Vukovic and M. Misawa (1988), *Phytochemistry*, **27**, 2147.
6. M. T. Misawa, A. Endo, J. Goodbody, C. Vukovic, C. Chapple, L. Choi and J. P. Kutney (1988), *Phytochemistry*, **27**, 1355.
7. W. G. W. Kurz, K. B. Chatson, F. Constabel, J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleight, K. L. Stuart and B. R. Worth (1981), *Planta Med.*, **42**, 22.
8. Y. Fujita, S. Takahashi and Y. Yamada (1984), *European Congress on Biochemistry*, 1-161.
9. F. V. Schenk and A. G. Hildebrandt (1972), *Can. J. Bot.*, **50**, 199.
10. O. K. Frearson, J. B. Power and E. C. Cocking (1973), *Dev. Biol.*, **33**, 130.
11. T. Murashige and F. Skoog (1962), *Physiol. Plant.*, **15**, 473.
12. J. P. Renaudin (1984), *J. Chromatography*, **291**, 165.
13. K. Hirata, A. Yamanata, N. Kurano, K. Miyamoto and Y. Miura (1987), *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1311.
14. F. Constabel, S. Rambold, K. B. Chatson, W. G. W. Kurz and J. P. Kutney (1981), *Plant Cell Rep.*, **1**, 3.
15. R. D. Shillito, J. Paszkowski and I. Potrykus (1983), *Plant Cell Rep.*, **2**, 244.
16. J. F. Tremouillaux-Guiller, F. Andreu, J. Creche, J. C. Chenieux and M. Rideau (1987), *Plant Cell Rep.*, **6**, 375.
17. V. Deluca, J. Balsevich, R. T. Tyler, U. Elilert, B. D. Panchuk and W. G. W. Kurz (1986), *J. Plant Physiol.*, **125**, 147.
18. T. Hashimoto, J. Matsuda, S. Okabe, Y. Amano, D. J. Yun, A. Hayashi and Y. Yamada (1990), *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 775.

(Received; February 19, 1991, Accepted; April 30, 1991)