

기내배양한 은행 유식물에서의 Ginkgolide의 생산

전미희 · 정상현 · 전순화 · 허 훈 · 김영중
서울대학교 약학대학

Ginkgolides Production in Embryo-derived *Ginkgo biloba* Plantlet

Mee Hee Jeon, Sang Hyun Sung, Soon Hwa Jeon, Hoon Huh and Young Choong Kim
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—A platelet activating factor(PAF) antagonist ginkgolides produced from *Ginkgo biloba* are well known for their potential usage in septic shock and other PAF related diseases. Even though they are extracted from the leaves and on occasion the root bark, the exact biosynthetic site and pathway have not proved yet. In order to locate the enzymes involved and elucidate the biosynthetic site of the compounds, embryo-derived aseptically intact plantlet and plantlet without root have been cultured on 0.3% active carbon-containing solid Murashige and Skoog's medium. The leaves from the six-week-old normal plantlet contained similar amount of ginkgolide B to that of outdoor plant leaves, while the plantlets without root had less than 30% of the ginkgolide B compared to the *in vitro* intact plantlets. The results suggest that the ginkgolides may be synthesized in the root and transported to the aerial part.

Keywords—*Ginkgo biloba* · platelet activating factor (PAF) · ginkgolide B · embryo-derived plantlets

은행잎은 유럽 작곡과 우리나라를 비롯한 아시아에서 제재화되어 각종 순환기 장애와 shock의 예방 치료제로써 널리 쓰이고 있다.¹⁾ 은행잎의 유효 성분 중 ginkgolide는 은행나무 속에만 존재하는 diterpene 화합물로서 혈소판 활성화 인자(platelet activating factor)에 대한 길항작용이 널리 알려져 있다.²⁾ 혈소판 활성화 인자는 immunoglobulin E 등이 관여하는 면역 반응시 각종 면역 세포에서 유리되고 혈소판 막에 존재하는 수용체와 결합하여 혈소판을 활성화시키고 혈액내 세포의 응집 및 이와 관련된 다양한 병리 현상과 깊이 관련되어 있음이 최근 연구에 의하여 밝혀지고 있다.³⁾ 따라서 ginkgolide는 혈소판 활성화 인자를 매개로 하여 일어나는 병리 현상을 제어할 수 있어 의약품으로써 개발 가능성

을 크게 인정 받고 있다. 그러나 은행잎 중의 수율이 낮은 까닭에 이 화합물을 생산하기 위한 대체방안을 찾으려는 노력이 계속되어 왔다. 그 결과 1988년 Corey 등⁴⁾은 혈소판 활성화 인자에 대한 길항작용이 가장 강력한 ginkgolide B를 전합성하는데 성공하였으며 허⁵⁾와 전 등⁶⁾은 식물조직배양에 의한 ginkgolide의 생산을 보고하기에 이르렀다. 그러나 이러한 방법들은 아직 그 생산성이 대단히 낮아 실용화하기에 많은 제약이 따르고 있다.

본보에서는 은행종자로 부터 배아를 적출하여 고형배지에서 식물을 유기시키고 일정 기간동안 배양하였을 때 그 기내배양 유식물이 ginkgolide를 생산함을 보고하고자 하였다. 아울러 배측 발달을 제거하고 배아를 배양하였을때 유기되는

뿌리가 없는 유식물의 ginkgolide 함량과 완전한 유식물의 ginkgolide 함량 비교를 통하여 은행의 뿌리가 ginkgolide의 주 생합성 부위임을 제시하였다.

실험 재료 및 방법

실험 재료

실험 재료—본 실험에서 사용한 은행 종자는 경동시장에서 구입하거나 서울대학교 관악캠퍼스 내에서 자라는 은행나무에서 채집하였다.

시약 및 기기—실험에 사용한 배지 및 배지의 구성 성분인 각각의 무기염은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. GC분석에 의한 ginkgolide의 확인 및 정량을 위한 유도체화 시약인 Trisil/BSA in dimethylformamide(DMF)는 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, U.S.A.)에서 구입하였다. 표준물질인 GKA, GKB는 독일 Heidelberg 대학의 H. Schick 박사로부터 제공받았다.

Ginkgolide를 정량하기 위하여 사용한 GC는 Hewlett-Packard Model 5890 series II이고 detector는 flame ionization detector, column은 HP-1 column(0.2 mm×17 m; Hewlett-Packard)을 사용하였다.

실험 방법

배아 배양—은행 배아의 배양은 Ball⁷⁾의 방법을 응용하였다. 즉 은행 종자를 70% 에탄올에 5분간 침적하여 소독한 후 배아를 무균적으로 적출하여 한천 1.1%, 활성탄 0.3%를 첨가한 Murashige and Skoog(MS) 기본 배지에 배축을 치상하고 배양하여 정상 유식물을 유도시켰다. 또한 뿌리의 발달을 억제하기 위하여 배축 말단을 제거하고 배양하여 뿌리가 없는 식물을 유도시켰다. 배아는 26±1°C에서 명 상태 및 암 상태로 나누어서 배양하였으며 명 상태는 광도 1000 lux, 광주기 16시간으로 고정하여 배양하였다. 배양한 유식물을 3주 간격으로 취하여 각 부위별 ginkgolide의 함량을 측정하였다.

Ginkgolide 분획의 추출 및 정제—유식물을 뿌리, 줄기, 잎으로 분리해서 건조시킨 후 잘게 분쇄해서 증류수와 acetone(1:1, v/v) 혼합용매

10 ml로 초음파 장치를 이용하여 15시간씩 5회 반복 추출하였다. 추출액을 여과한 후 감압농축시켜서 acetone을 증발시키고 잔여 수층을 *n*-hexane 10 ml씩으로 5회 추출하여 비극성 물질을 제거하였다. 다시 잔여 수층을 1N-HCl로 pH 2.0으로 산성화시킨 후 ethyl acetate 10 ml씩으로 5회 추출하였다. Ethyl acetate 분획을 감압농축시킨 후 증류수 5 ml에 현탁시키고 다시 diethyl ether 10 ml씩으로 5회 추출하여 추출액을 합하였다. Diethyl ether 분획에 sodium sulfate를 첨가하여 수분을 제거한 후 감압농축시키고 0.45 μm 한외여과막을 사용하여 여과한 후 분석에 사용하였다.

Gas chromatography(GC)에 의한 ginkgolide의 정량—Ginkgolide의 정량은 대체로 Carrier⁸⁾ 등의 GC 방법으로 분석하였다. 분리한 ginkgolide 분획을 반응 용기(Reacti-Vial)에 옮겨 질소가스 하에서 용매를 완전히 증발시킨 후에 Trisil/BSA in dimethylformamide(DMF) 100 μl을 가한 후 마개를 막고 반응액을 완전히 혼합시킨 후 73°C에서 1시간 반응시켜 GC로 분석하였다. GC 분석조건은 column 온도 280°C, detector 온도 295°C, 운반 기체는 질소가스를 사용하였으며 유속은 0.5 ml/min이었다. Ginkgolide 함량은 ginkgolide A(GKA) 및 ginkgolide B(GKB)를 분석하여 얻은 표준검량선을 이용하여 결정하였다.

GC/MS에 의한 ginkgolide 확인—기내 배양한 유식물중의 ginkgolide의 확인은 GKA와 GKB 표준물질과 함께 GC/MS를 이용하여 확인하였다. GC/MS의 분석조건은 split ratio 1:10, interphase와 ion source의 온도는 300°C 이었으며 70 eV의 electron impact ionization을 이용하였다. Column의 온도는 100°C에서 300°C까지 분당 20°C씩 증가시켰으며 운반 기체의 속도는 0.89 ml/min이다. 크로마토그램은 selected ion monitoring 방법을 사용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

식물 세포내에서의 이차대사산물의 생산은 이 화합물들의 강력한 생리활성과 의약품으로의 응

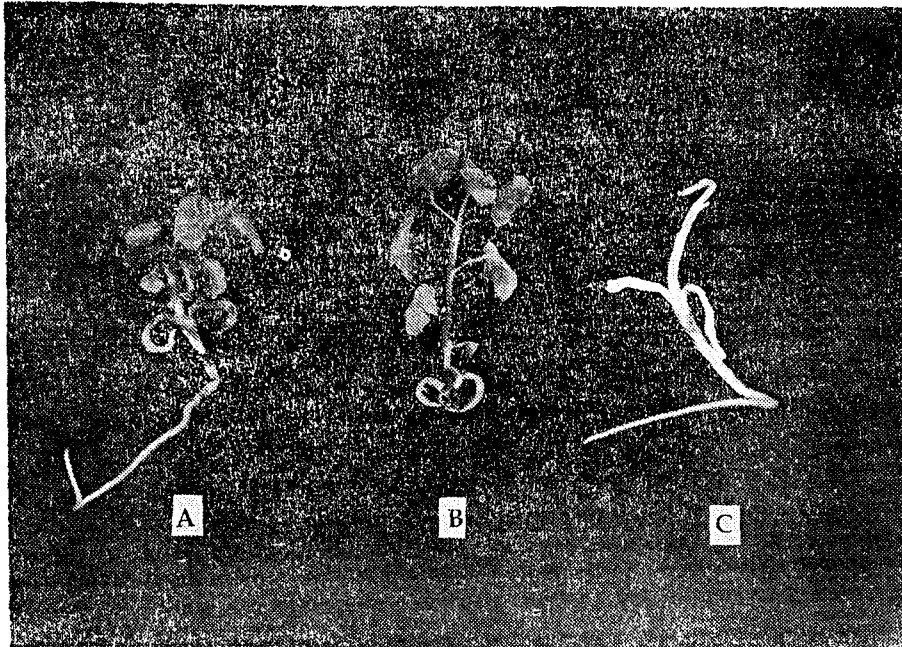


Fig. 1. Ginkgo embryo-derived plantlet growth *in vitro*.

- A : plantlets with root under illumination
 B : plantlets without root under illumination
 C : plantlets with root under the dark

용 가능성으로 인하여 오랫동안 연구대상이 되어왔다. 몇몇의 예외적인 경우를 제외하고는 분화된 세포내에서의 이차대사산물의 생산능은 미분화된 세포에 비해 월등히 높은 것으로 알려져 있다. 은행의 경우도 배양한 미분화세포에서의 ginkgolide 생산 수율은 최적의 배지조건하에서도 노지에서 성장한 은행잎이나 혹은 온실에서 키운 은행 묘목의 잎에 비해 대단히 낮았다.^{5,6)} 한편, 은행잎에서 생산되는 ginkgolide의 중요성에 비추어 이 화합물들의 생합성에 관련된 연구는 대단히 미흡한 실정이다. 이는 배양 중의 미분화세포에서는 ginkgolide 생산능이 낮아 ginkgolide의 생합성 관련 유전자의 발현 연구에 어려움이 따른다는 것이 큰 이유 중의 하나이다. 따라서 ginkgolide의 생합성연구에 ginkgolide 생산능이 활발한 분화세포를 이용함이 합리적이라고 하겠다.

유식물의 유기 및 성장

적출한 배아를 고형배지에 치상하고 배양하였을 때, 유식물이 유기되고 이들 유식물은 그 배

양 환경과 조작 조건에 따라 서로 다른 형태로 성장하였다. 명 상태에서 배양한 식물체는 뿌리, 줄기, 잎이 골고루 발달한 정상적인 식물체로 성장하였다. 암 상태에서는 잎이 거의 발달하지 않고 줄기와 뿌리만 가진 식물체로 성장하였다. 배축의 발달을 제거하고 유기시킨 유식물은 뿌리의 발달 없이 잎과 줄기만 발달한 변형된 유식물로 성장하였다(Fig. 1). 이 3종류의 유식물은 9주 동안 배양하면 성장 최대점에 도달하였다(Fig. 2).

유식물에서의 ginkgolide 함량

명 상태에서 정상적으로 배양된 유식물체의 부위별 ginkgolide 함량(Fig. 3)은 잎과 줄기는 9주 동안 배양한 식물체에서 각각 $11.4 \times 10^{-2}\%$ 와 $9.5 \times 10^{-2}\%$ 로 가장 높았고, 뿌리에서는 6주 동안 배양한 식물체에서 $5.1 \times 10^{-2}\%$ 로 최고치를 나타내었다. 배양기간에 따른 ginkgolide의 함량을 비교해 보면 3주 동안 배양한 식물체에는 잎보다 뿌리에 많은 ginkgolide가 함유되어 있었으나, 6주 이상 배양한 식물체에는 잎에 더 많은

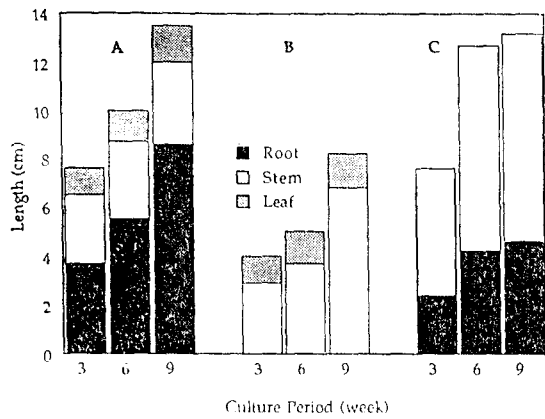


Fig. 2. Growth profile of ginkgo embryo-derived plantlets
 A : plantlets with root under illumination
 B : plantlets without root under illumination
 C : plantlets with root under the dark

ginkgolide가 함유되어 있었다(Table I). 암 상태에서 배양한 식물체의 경우 줄기는 6주 동안 배양한 식물체에서 ginkgolide 함량이 $9.8 \times 10^{-2}\%$ 로 가장 높았고 뿌리의 경우에는 3주 동안 배양한 식물체에서 $11.0 \times 10^{-2}\%$ 로 가장 높았다. 이 식물의 경우에도 배양 기간이 경과할수록 줄기 부위의 ginkgolide 함량이 증가됨을 알 수 있었다(Table II).

두 종류의 유식물 중의 ginkgolide 함량분석 결과는 ginkgolide 생합성에 있어서 뿌리의 중요성을 암시하고 있다. 즉 암 상태에서 유기된 유식물체의 뿌리중 ginkgolide 함량은 잎의 발달이 거의 없음에도 불구하고 잎이 정상적으로 발달한 유식물의 것과 유사하다. 즉 잎의 유무에 상관없이 ginkgolide는 뿌리에서 생합성 되고 있다는 것을 시사한다. Ginkgolide 생합성에 있어

Table I. Ginkgolide A(GKA) and ginkgolide B(GKB) contents in embryo-derived plantlets with root under illumination ($\times 10^{-2}\%$ Dry weight)

	Leaf		Stem		Root	
	GKA	GKB	GKA	GKB	GKA	GKB
3 Weeks	$0.6 \pm 0.1^*$	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.2
6 Weeks	4.0 ± 0.3	5.9 ± 0.4	2.6 ± 0.5	5.5 ± 0.7	1.9 ± 0.1	3.2 ± 0.1
9 Weeks	7.2 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.8 ± 0.7	4.7 ± 0.8	2.2 ± 0.1	2.7 ± 0.2

*N=6~8, Mean±S.D.

Table II. Ginkgolide A and ginkgolide B contents in embryo-derived plantlets with root under the dark ($\times 10^{-2}\%$ Dry weight)

	Stem		Root	
	GKA	GKB	GKA	GKB
3 Weeks	$1.8 \pm 0.2^*$	2.3 ± 0.4	2.8 ± 0.3	8.2 ± 0.4
6 Weeks	2.1 ± 0.5	7.7 ± 0.6	0.9 ± 0.1	3.6 ± 0.3
9 Weeks	4.2 ± 0.3	5.2 ± 0.2	2.5 ± 0.2	4.2 ± 0.2

*N=6~8, Mean±S.D.

서의 뿌리의 중요성은 뿌리의 발달을 제어한 변형 유식물의 ginkgolide 함량 분석 결과에서 확인할 수 있었다. 배측의 발달을 제거한 배아에서 유기된 유식물의 경우 잎은 6주 동안 배양한 식물체에서 ginkgolide 함량이 $2.2 \times 10^{-2}\%$ 로 가장 높았고 줄기는 3주 동안 배양한 식물체에서 $3.4 \times 10^{-2}\%$ 로 가장 높았다 (Table III). 그러나 정

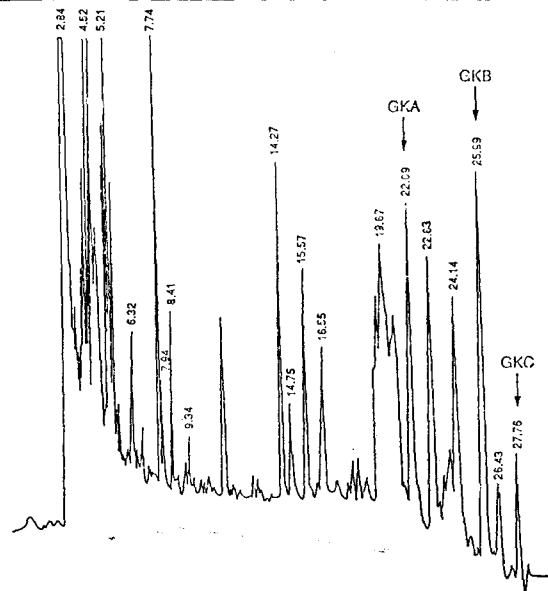


Fig. 3. Gas chromatogram of the ginkgolides fraction of the ginkgo embryo-derived plantlet

Table III. Ginkgolide A and ginkgolide B contents in embryo-derived plantlets without root under illumination ($\times 10^{-2}\%$ Dry weight)

	Leaf		Stem	
	GKA	GKB	GKA	GKB
3 Weeks	trace	trace	1.5 \pm 0.3*	1.9 \pm 0.2
6 Weeks	0.8 \pm 0.1	1.4 \pm 0.4	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
9 Weeks	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1

*N=6~8, Mean \pm S.D.

상적인 식물체의 ginkgolide 함량보다는 훨씬 낮은 수준으로 최고 함량을 비교하여 보면 잎에는 정상 식물체의 27.4% 줄기에는 36.8%에 불과한 ginkgolide가 함유되어 있는 것을 알 수 있다.

이러한 결과는 ginkgolide 합성에 있어서 뿌리의 중요성을 거듭 확인해 주고 있다. 즉 은행나무는 지상부의 발달 유무에 관계없이 뿌리가 제거되면 잎에서의 ginkgolide 함량이 대단히 낮아지는 것을 알 수 있다.

최근 허와 Staba⁵⁾는 은행나무의 싹이 트기전 어린 가지들 모델로 하여 은행의 뿌리가 ginkgolide 생합성에 필수적임을 보였다. 그러나 이들은 또한 은행의 shoot tip culture의 잎에서 뿌리 없이도 적은 양의 ginkgolide를 검출할 수 있었으므로 ginkgolide의 주된 합성부위는 뿌리이나 잎에서도 생합성되는 것으로 여겨진다고 보고하였다. 이들이 결과는 배아유기 유식물 중의 ginkgolide 함량 결과에 근거한 본 실험의 결과와 일치하는 것으로서 뿌리의 성장이 저지된 변형 유식물의 잎에서도 소량이지만 검출 가능한 양의 ginkgolide가 생산되는 것으로 보아 어떤 기전에 의한 것인지는 불확실하나 잎에서도 ginkgolide의 생합성의 있을 수 있다는 것을 보여 주고 있다.

한편 토양에서 자란 은행나무의 잎과 명 상태에서 배아 배양으로 유기한 정상 유식물의 잎에서의 ginkgolide의 함량을 비교해 보면 은행나무의 경우 GKA와 GKB의 함량이 각각 건조중량으로 0.1~0.25%, 0.025~0.083%^{8,9)}이었고 명 상태에서 배양한 정상 유식물의 경우에는 0.072%와 0.059%이었다. 이상의 결과로 기내

배양한 유식물도 ginkgolide를 토양에서 자란 은행잎의 ginkgolide 수율과 거의 비슷한 수율로 생산하는 것을 알 수 있다.

본 연구 결과는 ginkgolide가 은행중의 어떤 기관에서 생합성 되는지는 더욱 깊은 연구에 의해 결정적인 증거가 제시되어야 하겠지만 은행의 뿌리가 ginkgolide의 생합성에 필수적임을 보여주고 있으며 기내 배양한 배아 유래 유식물이 생합성 연구에 유용한 모델이 될 수 있음을 시사한다.

감사의 말씀—이 논문의 일부는 1992년도 신의약품 개발 연구 센터의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

(1993년 11월 9일 접수 : 11월 29일 수리)

참 고 문 헌

- Huh, H. and Staba, E.J.: *J. of Herbs, Spices, and Medicinal Plant* 1, 91 (1992).
- Braquet, P.: *Drugs of the Future* 12, 643 (1987).
- Braquet, P.: "Ginkgolides—Chemistry, Biology, Pharmacology and Chemical Perspectives," ed. by Braquet, P., Vol. 1, J.R. Prous Science Pub., Barcelona, pp. xv-xxxiv (1989).
- Corey, E.J., Kang, M.C., Desai, M.C., Ghosh, A.K. and Houpis, I.N.: *J. Am. Chem. Soc.* 110, 649 (1988).
- Huh, H. and Staba, E.J.: *Planta Med.* 59, 232 (1993).
- Jeon, M.H., Seong, S.H., Jeon, S.H., Huh, H. and Kim, Y.C.: *Archiv. Pharm. Res.* 16, 244 (1993).
- Ball, E.: *Amer. J. Bot.* 43, 802 (1956).
- Carrier, D.J., Coulombe, P., Mancini, M., Neufeld, R., Weber, M. and Archambault, J.: "International Congress on Plant Tissue and Cell Culture", ed. by Nijkamp, H.J.J. et al., Academic Publisher, Amsterdam, pp. 614~618 (1990).
- van Beek, T.A., Scheeren, H.A., Rantio, Melger, W.C. and Lelyveld, G.P.: *J. Chromatogr.* 543, 375 (1991).