

한국산 주목의 세포배양에 의한 Taxane 유도체의 생산(I)

신승원* 김유선

덕성여자대학교 약학대학

Production of Taxane Derivatives by Cell Culture of Korean *Taxus* Species (I)

Seung-Won Shin* and You-Sun Kim

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

Abstract - Undifferentiated callus were induced from the young leaves of *Taxus cuspidata* by treatment with various combinations of plant growth hormones. The effects of light and culturing temperature on production of baccatin III, the precursor of taxol, were studied. The contents of baccatin III in the cultured callus were analysed by HPLC. The illumination of fluorescence and administration of isoleucine, one of the possible substrates in biosynthesis of terpenoids, to the culturing media increased the production of baccatin III.

Key words - *Taxus cuspidata*, cell culture, baccatin III, isoleucine

*Taxus brevifolia*의 나무껍질 추출물의 항암작용이 1960년대에 확인된 이후 1971년 그 주성분으로 taxol이 분리되고 이 계통의 성분이 항암작용의 범위가 넓고 Hodgkin's 병, germ cell tumor, childhood leukemia, 유방암, 난소암 등에 탁월한 효과를 나타내자 천연물로부터의 항암제 개발 선도 물질로 각광을 받게 되었다.¹⁻⁵⁾

그러나 한편 이 성분을 식물로부터 추출하여 생산하는데 있어서는 이 식물이 비교적 고급 수종이며 사용부분이 나무껍질이고 taxol 함유율이 아주 낮다는 점, 자연보호문제등으로 생산단가가 높고 지속적인 자원확보에 어려움이 있다. 이에 대한 해결책으로 taxol의 전합성 및 반합성법이 연구되었으며 특히 taxol생합성의 전구체인 baccatin III 및 10-acetylbaccatin III를 출발물질로 하는 반합성법에 의한 생산법이 유망하다.¹⁾

그외 껍질이외의 다른 부분의 이용가능성이나 *T.*

baccata, *T.cuspidata* 등 타종의 식물 및 *Cephalotaxus* 속 식물 등 타 식물자원의 개발연구와 더불어 주목의 세포배양법 및 주목류의 껍질에 자생하는 진균류의 배양에 의한 효율적인 생산법이 연구되어 상업화의 단계에 이르렀다.⁷⁻²⁵⁾ 그러나 주목세포의 특히 느린 분열속도 및 taxol의 생산성 등의 문제등으로 보다 효율적인 생산법에 대한 연구가 여러 연구자에 의해 진행되고 있다.

본 연구자의 실험에서 한국산 주목 *Taxus cuspidata*의 어린 잎으로부터 각종 plant growth hormone의 조건에서 callus를 유도율을 비교하고 배양하여 taxol의 생산성증가를 연구했는데, 각종 조건에서 배양세포내의 taxol 생성율은 만족할만하지 못하였으나, 반면 생합성 전단계 물질인 baccatin III의 함량이 높은 것이 관찰되었다. 따라서 이 cell line을 이용하여 baccatin III를 생산의 생산성을 높일 수 있는 방법을 연구하였다. 첫째로 배양계에 생합성전구체 혹은 substrate가 될 수 있는 물질을 첨가하는 방법을 시도 했다. Baccatin III는 diter-

*교신저자 : Fax 02-901-8386

terpenoid 생합성과정에서 밝혀진 것이 많지 않은데, terpenoid 생합성의 일반적인 전구체인 mevalonate 나 shikimate는 자체가 고가이기 때문에 전구체 첨가에 의한 생산성 증가의 의미가 없다고 생각되어 본 실험에서는 배지에 고농도의 isoleucine을 첨가하여 baccatin III의 생산량의 변화를 실험하였다. Isoleucine, leucine등의 아미노산은 terpenoid 생합성의 일반적인 precursor는 아니지만 식물중의 C₅-unit의 precursor로서 작용하는 경우가 상당수 발견되고 있다. Nabeta 등²⁶⁾은 *Perilla*속 식물의 배양에 있어서 l-leucine의 첨가로 α-pinene의 생성량을 약 15배 정도 증가시켰고, Peter 등²⁷⁾은 U-[14C]-isoleucine, U-[14C]-leucine을 사용하여 실험한 결과 이들이 terpene 생합성 반응계에 관여함을 밝혔다.

이와 같은 사실을 기초로 하여 본 논문에서는 주목의 세포배양에 의한 taxane 유도체의 효율적 생산 연구의 일환으로, taxol의 반합성재료인 baccatin III의 효율적 생산법 개발을 목표로 한 첫단계 실험으로 온도 및 광선 그리고 isoleucine의 첨가 주무름 callus 내의 baccatin III 생합성 및 callus 증식에 미치는 영향을 고찰하여 보고한다.

재료 및 방법

Callus 유도 - 식물재료는 4월말에서 5월중순 사이에 서울에서 채배중인 *Taxus cuspidata*의 어린 잎을 채취하여 sodium hypochlorite(유효염소량 0.5%)로 1회, 주사용증류수로 4회 세척한 후 사용하였고, yeast extract를 첨가한 Murashige and Skoog's Medium²⁸⁾ (pH=5.75-5.80)을 기본배지조성으로 하되 식물생장호르몬의 농도 및 비율을 다음과 같이 여섯가지로 다르게 하여 제조한 배지에서의 callus 유도 정도를 비교하였다.

배지의 생장호르몬조건: 1) 2 ppm NAA+1 ppm kinetin, 2) 2 ppm NAA+2 ppm kinetin, 3) 4 ppm NAA+10 ppm kinetin, 4) 2 ppm IAA+2 ppm kinetin, 5) 4 ppm 2,4-D+2 ppm kinetin

Callus 배양 - 위에서 유도된 callus를 3-4년간에 걸쳐 배양온도는 25 °C, 광선은 차단한 상태에서 계대배양하면서 Murashige and Skoog's 배지와 B₅²⁹⁾ 배지의 기본조성에 2,4-D, IAA, NAA와 kine-

tin을 1-10 ppm 사이의 여러 농도의 조합으로 하여 제조한 배지에서의 callus 성장속도를 비교하여 가장 빠른 성장을 보이는 호르몬조건을 선정했다. 그 결과 기본 배지에 2,4-D 2 ppm과 kinetin 1 ppm을 가한 배지에서의 생장율이 가장 높았기 때문에 다음 단계로 이와같은 조성의 배지를 제조하여 22 °C, 25 °C, 28 °C에서 각각 callus를 배양하여 이식후 84일 부터 1-2주간의 성장속도 및 baccatin III의 생성량을 비교하였다. 또한 배양온도를 25 °C로 고정하고 형광광선(1000Lux)을 조사한 경우와 광선 차단하에 배양한 것을 비교하고, l-isoleucine 첨가 (2 g/l)의 영향도 비교하였다.

Baccatin III의 정량 - 각 조건에서 배양한 callus를 methanol로 추출하여 증발농축한 후 잔사를 증류수에 녹여 dichloromethane으로 2회 추출하여 용매를 날려 보낸후 HPLC 용 methanol 2 ml에 녹여 microfliter(5 μ)로 2회 여과하고 sepak으로 전처리하여 HPLC 정량용 시료로 하였다. 이 시료를 taxol, baccatin III와 같이 silicagel plate상에 spot하고 acetone:methanol=1:1로 전개시킨후 anisaldehyde 황산시약으로 발색시킨 결과 Rf=0.73에서 baccatin III의 흑청색 spot를 확인하였다.

Baccatin III의 정량³⁰⁾에 사용한 HPLC는 Waters의 Solvent Delivery System 501, column은 μ-bondapak C₁₈-phenyl, 전개용매는 MeOH:H₂O:acetonitrile (20:37:43), 1.0 ml/min, 시료의 1회 주입량은 50 μl였다. Baccatin III 표준품 (Sigma, HPLC, 95%)으로 227 nm에서 methanol용액의 각 농도에 따른 peak area를 측정하여 검량선을 작성하였다. 검량선의 회귀 방정식은 Y=1.0063×+7.8994 였다. 주목callus의 methanol 추출물의 HPLC 상에서는 4.18 min에서 baccatin III의 peak가 확인 되었고, baccatin III의 양은 callus 생중량 1 g당의 생성량(μg)으로 환산하였다.

결과 및 고찰

Callus 유도 및 생장율 - 주목의 잎으로 부터의 callus 유도율은 생장호르몬으로 2,4-D 1 ppm과 kinetin 1 ppm을 첨가한 경우에 61.5%로 가장 높게 나타났고, NAA 2 ppm, kinetin 1 ppm을 첨가한 배지에서의 유도율이 16.2%로 가장 낮았다.

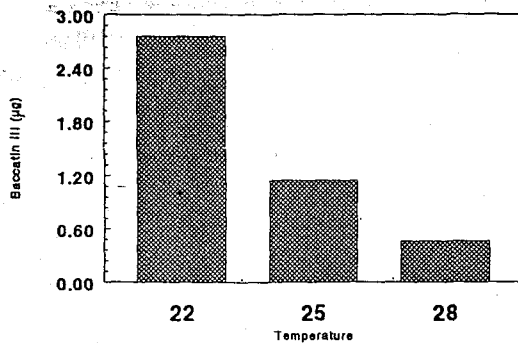


Fig. 1. Production of baccatin III(µg) in the cultured callus(g) at 22 °C, 25 °C and 28 °C.

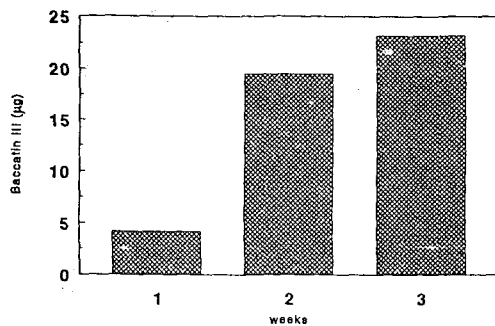


Fig. 2. Production of baccatin III(µg) in the callus(g) cultured with the illumination of fluorescence.

온도조건에 따른 1주간의 callus 성장을 비교한 결과 22 °C에서 가장높은 성장을 나타내었고, 다음이 25 °C, 28 °C의 순서로 온도가 높아질수록 성장속도는 감소되었다.

2주간 광선을 조사한 상태에서 배양한 callus는 광선을 차단한 상태에서의 것과 성장율에 있어서 뚜렷한 차이는 나타내지 않았으며 isoleucine의 첨가에 의해서도 증가되지 않았다.

Baccatin III의 생성—Fig. 1에 나타난 바와 같이 배양한 callus내의 baccatin III의 생성량은 온도에 따라 현저한 차이를 보였다. Callus 1 g당 baccatin III 생성량은 22 °C에서 배양한 경우 2.76 µg, 25 °C에서 1.15 µg, 28 °C에서 0.46 µg으로 22 °C 배양의 경우 28 °C 배양시에 비해 6배의 baccatin III가 생성되었다.

광선의 조사는 baccatin III의 생성에 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났는데 2주 광선조사후의 baccatin III의 생성량은 배양callus 1 g당 19.48

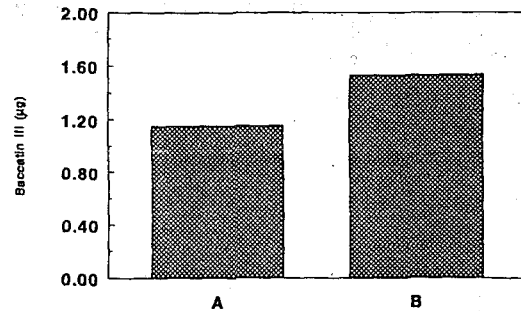


Fig. 3. Baccatin III(µg) in the callus(g) cultured on the medium containing isoleucine (A) and without isoleucine (B).

µg이고, 3주조사시 23.17 g으로 같은조건에서 광선만을 차단하고 배양한 callus에 비해 성분 생성량이 20.1배에 달하였다(Fig. 2).

Terpene생합성 관련물질로 추정되는 물질중 하나인 아미노산 isoleucine을 첨가한 배지에서 25 °C, 광선차단상태에서 배양한 callus는 g당 1.53 g의 baccatin III를 생산하여 isoleucine을 첨가하지 않은 경우에 비해 생성량이 1.33배 더 많은 것으로 나타났다(Fig. 3).

사 사

본 연구는 덕성여자대학교 약학연구소의 95년도 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Gunda I. G., Thomas, T. C., Iwao, O. and Dolatri, M. V. (1995) Taxane anticancer agent. basic science and current status, 31-52. American Chemical Society, Washington DC.
- Kingston, D. G. I., Hawkins, D. R. and Overington, L. (1982) New taxanes from *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* 45: 466-470.
- Kingston, D. G. I., Samaranyake, G. and Ivey, C. A. (1990) The chemistry of taxol, a clinically useful anticancer agent. *J. Nat. Prod.* 53: 1-12.
- Issaq, H. J. (1990) Recent advances in multimodal thin-layer Chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 9: 36-40.
- Rowinsky E. R., Lorraine A. and Loss, C. D.

- (1990) Taxol: A novel investigational anti-tubule agent. *Journal of the National Cancer Institute* 82: 1247-1259.
6. Vidensek, N., Lim, P., Campbell, A. and Carlson, C. (1990) Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species. *J. Nat. Prod.* 36: 1609-1610.
 7. Dixon, R. A. (1985) Plant cell culture, a practical approach, 3. IRL Press, Washington DC.
 8. Yoshizaki, F., Aagihashi, R. and Hisamichi, S. (1988) Determination of taxinine and seasonal variation of its content in the leaf of Japanese yew (*Taxus cuspidata*). *Shoyakugaku Zasshi* 42: 151-152.
 9. Yoshizaki, F., Fukuda, M., Hisamichi, S. and Ishida, T. (1988) Structures of taxane diterpenoids from the seeds of Japanese yew, *Taxus cuspidata*. *Chem Pharm. Bull.* 36: 2908-2102.
 10. Senilh, V., Blechert, S., Colin, M., Guenard, D., Picot, F., Potier, P. and Varenne, P. (1984) New analogs of taxol extracts from *Taxus baccata*. *J. Nat. Prod.* 47: 131-137.
 11. Kim, T. H. (1990) A study on the Biological Activity of *Taxus* spp. *Kor. J. Pharmacogn.* 21: 142-147.
 12. Stasko, M. W., Witherup, K. M., Ghiorzi, T. J., Mc Cloud, T. G., Look, S., Mushik, G.M. and Issaq, H. J. (1989) Multimodal thin layer chromatographic separation of Taxol and related compounds from *Taxus brevifolia*. *J. Liq. Chromatogr.* 12: 2133-2143.
 13. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. and Mc Phail, A. T. (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Amer. Chem. Soc.* 93: 2325-2327.
 14. Westgate, P. J., Curtis, W. R., Emery, A. H., Hasegawa, P. M. and Heinsteins, P. F. (1991) Approximation of continuous growth of *Cephalotaxus harringtonia* plant cell cultures using fed-batch operation. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 241-246.
 15. Flores, H. E. and Scringnoli, P. J. (1991) *In vitro* culture and precocious germination of *Taxus* embryos. *In Vitro Plant* 27: 139-142.
 16. Gueritte-Voegelein, F. and Guenard, D. (1987) Taxol and derivatives: A biogenetic hypothesis. *J. Nat. Prod.* 50: 9-18.
 17. Parveen, N. A., Taufeeq, H. M. and Khan, N. U. (1985) Biflavones from the leaves of Himalayan yew: *Taxus wallichiana*. *J. Nat. Prod.* 48: 994.
 18. Misawa, M., Hayashi, M. and Takayama, S. (1985) Accumulation of antineoplastic agents by plant tissue cultures. (Conference paper) Primary Secondary Metab. *Plant Cell Cult.* 235-246. Allelix, Kyowa-Hakko.
 19. Heinsteins, P. F. (1985) Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.* 48: 1-9.
 20. Westgate, P. J., Curtis, W. R., Emery, A. H., Hasegawa, P. M. and Heinsteins, P. F. (1991) Approximation of continuous growth of *Cephalotaxus harringtonia* plant cell cultures using fed-batch operation. *Biotech. Bioeng.* 38: 241-246.
 21. Fortmann, R. C. and Johnson, D. L. (1984) Effect of simulated rainfall on removal and in situ formation of particles on *Taxus* needles. *Environ. Pollut. Ser. B.* 7: 297-316.
 22. Fortmann, R. C. and Johnson, D. L. (1984) Characterisation of individual ambient aerosol particles retained on *Taxus* needles washed with water. *Environ. Pollut. Ser. B.* 8: 1-16.
 23. Westgate, P. J., Emery, A. H., Hasegawa, P. M. and Heinsteins, P. F. (1991) Growth of *Cephalotaxus harringtonia* plant-cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotech.* 34: 798-803.
 24. Blechert, S. and Guenard, D. (1990) *Taxus* alkaloids. *The alkaloids* 39: 195-238.
 25. Yoshizaki, F., Madarame, M., Takahashi, C. and Hisamichi, S. (1986) Principal constituents of the seeds of Japanese Yew (*Taxus cuspidata*). *Shoyakugaku Zasshi* 40: 429-431.
 26. Nabeta, K. and Sugisawa, H. (1983) Volatile components produced by callus tissues from three *Perilla* plants. In Charlabous, G. and Inglett, G. (eds), Instrumental analysis of foods, 65-84. Academic Press, New York.
 27. Peter, M.G., Woggon, W.-D., Schlatter, C., Schmid, H. (1977) Biosynthesis of cantharidin part 4. The incorporation of geraniol and farnesol into cantharidin. *Helv Chim Acta* 60: 844-866
 28. Thorpe, A. T. (1981) Plant tissue culture. 24-27.

- Academic Press, New York.
29. Gamborg, O. L. and Wetter, L. R. (1975) Plant Tissue Culture Methods, 4-5. National Research Council of Canada, Saskatoon.
30. Witherup, K. M., Look, S. A., Stasko, M. W., Mccloud, T. G., Issaq, H. J. and Muschik, G. M. (1989) High performance liquid chromatographic separation of taxol and related compounds from *Taxus brevifolia*. *J. Liq. Chromatogr.* 12: 2117-2132.

(1996년 9월 10일 접수)