

전구체 및 외부공급 Taxane이 세포배양에 의한 Taxane 생산에 미치는 영향

황 용 순 · 김 진 우 · 김 석 우 · *변 상 요 · †김 동 일
인하대학교 공과대학 생물공학과, *아주대학교 공과대학 생물공학과

Effects of Precursors and Exogenous Taxanes on Taxane Production by Cell Suspension Cultures

Yong-Soon Hwang, Jin-Woo Kim, Seok-Woo Kim, Sang-Yo Byun*, and Dong-Il Kim†

Dept. of Biological Eng., College of Eng., Inha Univ., Incheon 402-751, Korea

*Dept. of Biotechnology, College of Eng., Ajou Univ., Suwon, Kyunggi 441-749, Korea

ABSTRACT

Effects of three kinds of precursors as well as exogenous taxanes on the production of taxol and its derivatives were investigated in *Taxus cuspidata* and *Taxus brevifolia* cell suspension cultures. When geraniol was added as a precursor of geranylgeranyl pyrophosphate to enhance diterpenoid metabolism, production of some taxanes including taxol was enhanced. The time of addition and amount of feeding were found to be important factors. Feeding of camphor and menthol resulted in negative effects on taxol production. Influences of exogenous taxanes on taxane production by cell cultures were found to be very complicated. When taxol, baccatin III, cephalomannine were exogenously added into the culture, production of baccatin III, 7-epi-10-deacetyltaxol, 10-deacetyltaxol was increased respectively.

서 론

Taxol은 유방암과 난소암을 포함한 여러 가지 종류의 암에 대해 탁월한 치료 효과를 보이고 있는 차세대 항암물질로서, 이들 암세포에 대한 taxol의 작용기작은 기존 대부분의 항암제들이 tubulin으로부터 microtubule의 형성을 방해하는 것과는 달리 cell cycle 상의 G2 후반기 또는 M phase에 작용하여 microtubule의 합성을 촉진하고 안정화시켜 그후의 분해 과정을 억제하는 특이한 기작을 갖는 것으로 알려져 있다(1). 미국에서는 1983년에 FDA에 의해 임상실험이 시작되어, 10년 후인 1992년에 난

소암 치료제로 허가를 받아 Bristol-Myers Squibb사에 의한 판매가 허용되었으며 1994년에는 유방암의 치료에도 사용이 허가되었다. 하지만 taxol 사용에 있어 가장 큰 문제인 공급 부족을 해결하기 위하여 수피로부터 taxol을 직접 추출하지 않는 대체방법에 대한 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 여러 방향의 연구 중에서도 taxol의 수요를 충족시키기 위해서 가장 적절한 대안이 되는 것은 주목 세포배양에 의한 방법이라 할 수 있다.

식물세포가 특정산물을 과량 생산하도록 하기 위해 많이 사용되는 방법 중의 하나로 인위적으로 배지 내에 기지의 전구물질이나 중간대사물질을 첨가해 주는 것을 들 수 있다. 이러한 전구물질의 첨가를 통해 수율의 향상뿐만 아니라 생합성 경로상의 중요

† Corresponding Author

단계에 대한 정보도 얻을 수 있다는 장점이 있다. *Holarrhena antidysenterica* 배양에서 전구물질인 cholesterol 첨가에 의한 alkaloid 생산성을 증진시킨 것을 그 예로 들 수 있다(2). 그러나 첨가된 전구물질이 생합성 경로로 들어가지 않으나 세포의 생장을 억제하여 그 결과로 2차 대사산물의 생산이 자극된 것과 올바른 생합성 경로에서 목적 물질의 생산성 향상에 도움을 준 것과는 비교하여 이해되어야 한다. Taxol은 diterpenoid alkaloid이므로 그 생합성 경로를 어느 정도 예상할 수 있고 전구체로는 phenylalanine, lysine, benzoic acid, sodium acetate, mevalonic acid, menthol, geranyl acetate 등을 생각할 수 있다. Taxol 생산을 증대시키기 위하여 외부에서 전구체를 공급해 준 예로는 Strobel 등(3)이 ^{14}C 로 표지된 sodium acetate, mevalonolactone, phenylalanine, leucine을 주목 절편에 주입하여 이들 물질이 taxol의 생합성에 관여함을 밝힌 것과 Fett-Neto 등(4)이 *Taxus cuspidata* 배양에서 phenylalanine, benzoic acid, glycine, serine을 공급했을 때 taxol의 생산이 증대되었다고 한 보고를 들 수 있다.

본 논문에서는 먼저 식물세포배양에 의한 항암제 taxol의 생산에 있어서 diterpenoid인 taxol의 생산을 증대시키기 위해 예상되는 전구체들 중에서 geraniol, camphor 및 menthol의 효과를 살펴 보았다. 또한 taxol, baccatin III, cephalomannine을 외부에서 공급함으로써 taxol 생산을 자극하거나 biotransformation되어 결과적으로 taxol 생산에 영향을 줄 수 있다고 생각하여 이들 3가지 taxane을 인위적으로 공급하고 taxol과 관련 taxane의 생산에 미치는 영향을 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

외부 공급 taxane이 미치는 영향 연구에 사용된 *Taxus brevifolia*(Pacific yew) 현탁세포는 Dr. Henrik Pedersen(Rutgers University, U.S.A.)으로부터 제공받은 태평양 주목 절편에서 유도하였으며, 전구체 투여 실험에 사용된 *Taxus cuspidata*(Japanese yew) 현탁세포는 아주대학교 생물공학과에서 유도한 것을 사용하였다.

주목 현탁세포배양에 이용된 성장배지는 Schenk와 Hilderbrandt(SH) 기본배지에 탄소원으로 sucrose를 20g/L가 되도록 첨가하였으며, α -naphthaleneacetic acid(NAA) 5mg/L, 6-benzylamino-

purine(BAP) 0.2mg/L, vitamin 농축용액을 보충하여 첨가하였다. pH는 가압증기멸균 전에 1N NaOH를 사용하여 5.8이 되도록 하였다. 계대배양은 10일 간격으로 수행하였으며, 500mL Erlenmeyer flask에 200mL의 배지를 넣고 암소의 회전식 진탕배양기에서 120rpm, 25°C를 유지하였다. 생산배지로는 Bringi 등(5)이 개발한 생산배지를 기본배지로 하여 NAA 10mg/L, BAP 2mg/L와 vitamin 농축용액, amino acid 혼합용액을 첨가하였고 탄소원으로는 fructose 60g/L를 첨가한 생산배지(PMB6F)를 이용하였다. 생산배지는 성장배지에 비해 무기염류의 농도가 낮은 반면 당농도가 높은 차이점이 있다.

전구체

Taxol 생합성 전구체의 외부공급 영향을 살펴보기 위해서 선택한 camphor, menthol, geraniol은 Sigma사에서 구입하였다. 사용된 3가지 전구체는 ethanol에 녹여 filter sterilization하여 사용하였다.

Taxol 추출 및 분석

용매를 이용한 추출방법은 Wani 등(6)의 방법을 수정하여 사용하였다. 각 시료에서 세포와 배지를 포함한 전체 배양액과 동량의 CH_2Cl_2 를 첨가한 후 1시간 동안 초음파 분쇄하였다. 30분간 5°C에서 방치한 후 상 분리가 되면 아래쪽의 CH_2Cl_2 층에서 20mL을 취하여 용매를 감압증발시켰다. 용매가 완전히 증발된 후 시료를 HPLC-grade MeOH 2mL에 다시 녹이고 0.2 μm filter(Gelman Science, FP-200)를 이용하여 불순물을 제거하였다.

Taxol 및 관련 taxane의 분석은 HPLC를 이용하였다. HPLC는 영인 HPLC system에 Taxsil column(250 \times 4.6mm, MetaChem, U.S.A.)을 사용하였다. 전개용매의 조성은 MeCN:H₂O가 40:60이 되도록 하였고 isocratic 조건에서 분석하였다. 용매의 유속은 1.5mL/min으로 하였고 227nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. Taxol 및 taxane 표준시약 및 외부 공급 taxane은 미국 National Cancer Institute(Drug & Chemistry Branch, Developmental Therapeutic Program, Division of Cancer Treatment)로부터 제공받은 것을 사용하였다.

결과 및 고찰

Geraniol의 영향

Geraniol을 taxol의 생합성 전구체로 고려한 이유

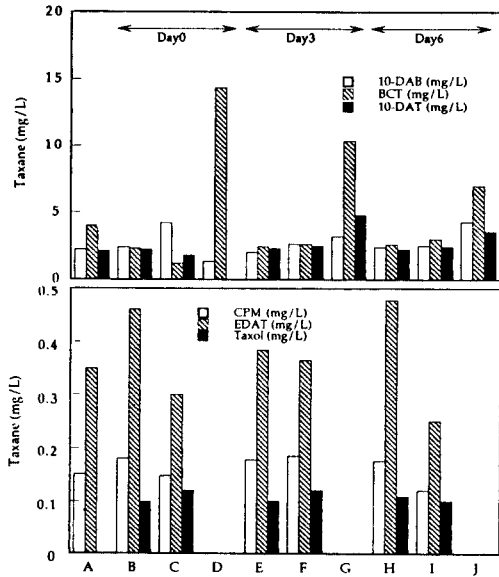


Fig. 1. Effect of geraniol feeding on taxol production in *T. cuspidata* suspension cultures: A, control; B, E, H, 0.1mM; C, F, I, 1mM; D, G, J, 10mM; 10-DAB, 10-deacetylbaccatin III; BCT, baccatin III; 10-DAT, 10-deacetyltaxol; CPM, cephalomannine; EDAT, 7-epi-10-deacetyltaxol.

는 diterpenoid 생합성 경로에서 중요한 전구체로 알려진 geranylgeranyl pyrophosphate(GGPP)의 공급에 적합하다고 판단했기 때문이다. 전구체의 투여시 투여시기와 양에 따라 결과가 달라지므로 여기서는 배양 시작 후 0, 3, 6일째에 0.1, 1, 10mM의 geraniol을 투여하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타낸 바와 같이, *Taxus cuspidata* 현탁세포배양 접종후 0, 3, 6일째에 geraniol을 10mM이 되도록 첨가했을 때는 baccatin III의 생산이 가장 크게 자극되었고 특히 초기 투여시에 그 증가가 더욱 확연하였다. 마찬가지로 0, 3, 6일째에 0.1mM이 되도록 첨가했을 때는 7-epi-10-deacetyltaxol의 생산이 증대되었다. 하지만 투여량이 10mM일 경우에는 7-epi-10-deacetyltaxol이 전혀 생산되지 않았다. Taxol의 경우는 geraniol 투여를 하지 않은 대조군에서는 발견되지 않았으나, 0.1, 1mM 투여시에는 투여시기와 상관없이 0.1mg/L 정도의 taxol이 생산됨을 알 수 있었다. 그러나 10mM 투여시에는 taxol이 생산되지 않았다. 투여시기와 상관없이 10mM geraniol 투

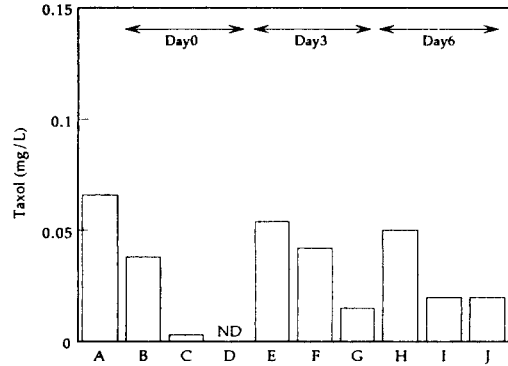


Fig. 2. Effect of camphor feeding on taxol production in *T. cuspidata* suspension cultures: A, control; B, E, H, 0.1mM; C, F, I, 1mM; D, G, J, 10mM; Day 0, 3, 6 means the addition time. ND means 'not detected'.

여시에는 cephalomannine도 탐지되지 않는 것으로 보아 과량의 geraniol의 존재는 baccatin III를 제외한 대부분의 side chain을 지니고 있는 taxane의 생성을 억제하는 것으로 보인다. 이상의 결과로부터 geraniol의 투여는 여러 가지 taxane 생합성과 상당한 연관성을 가지고 있다고 판단된다.

Camphor, menthol이 taxol 생성에 미치는 영향

Camphor와 menthol은 monoterpene 계열의 물질로서 직접적인 taxol 생합성의 전구체는 아니지만 세포내의 전환과정을 통해 taxol 생산에 필요한 전구체로 전환되어 taxol의 생산성을 증대시킬 수 있는 가능성이 있으며, camphor는 Holton 등(7)이 화학적인 taxol의 전합성 공정에서 최초 시작물질로 이용한 것으로 세포내에서도 taxol 생산에 영향을 미치리라 생각되어 조사하였다. 이를 위해서는 역시 *Taxus cuspidata* 현탁세포를 사용하였고, 각 물질을 배양 시작 0, 3, 6일째에 0.1, 1, 10mM씩 투여하였으며 그 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. Camphor와 menthol은 모두 세포생장을 저해하였으며 예상과 달리 taxol의 생산도 저해하는 효과를 보였다. Camphor의 경우에는 투여시기와 상관없이 투여량이 많을수록 taxol 생산이 적었으며, menthol 투여 경우에는 큰 영향을 보이지 않았다. 한편 camphor와 menthol은 모두 휘발성 물질이므로 배양 중 첨가하였을 때 세포에 의해 흡수되지 못했을 가능성도 고려해야 할 것이다.

Table 1. Effects of exogenous taxol on taxane production in *Taxus brevifolia* cultures :difference(numbers in box)=[produced taxanes of treated flask(mg/L)/produced taxanes of untreated flask(mg/L)]-100; +, more than control; -, less than control.

Treatment		Difference(% change from control)					
Time	Conc.	10-DAB	BCT	10-DAT	CPM	EDAT	TAXOL
Day0	0.2ppm	+50	+520	+50	+480	+230	-23
Day3	0.2ppm	+20	+570	-20	+350	+40	-38
Day6	0.2ppm	+50	+650	-20	+40	+20	-37
Day0	1ppm	+30	+570	+60	+770	+330	-7
Day3	1ppm	-10	+650	-10	+50	-10	-69
Day6	1ppm	+70	+950	0	+20	-30	-54
Day0	5ppm	+140	+530	-30	+2940	+180	-30
Day3	5ppm	+60	+720	+40	+1530	+230	-58
Day6	5ppm	+100	+1430	+80	+3110	+230	-16

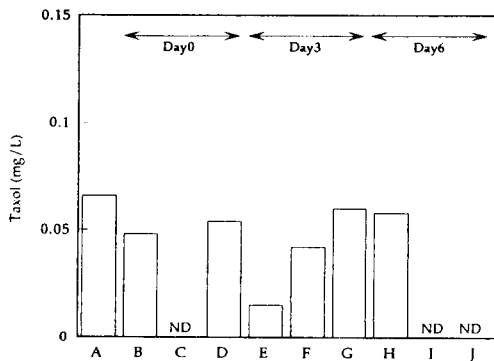


Fig. 3. Effect of menthol feeding on taxol production in *T. cuspidata* suspension cultures :A, control; B, E, H, 0.1mM; C, F, I, 1mM; D, G, J, 10mM; Day 0, 3, 6 means the addition time. ND means 'not detected'.

외부공급한 taxane의 영향

Taxol의 경우 정확한 생합성 경로가 밝혀져 있지 않으나 최종 산물이 아닐 것이라는 것은 생산된 후 그 양이 감소하거나 감소후 다시 증가한다는 사실로 추측할 수가 있다(8). 즉 유사한 taxane으로 상호변환이 일어날 가능성이 높은 것이다. 따라서 여기서는 *Taxus brevifolia* 현탁세포를 이용하여 외부에서 세 가지 taxane을 공급해 주고 배양중 그 양의 변화를 관찰함으로써 세포내 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 배양된 식물세포에 의해

외부공급한 전구체가 생물학적 변환(biotransformation)에 의한 구조변화도 가능하므로, taxol과 유사 물질인 baccatin III와 cephalomannine을 공급했을 때 이들이 주목세포에 의해 biotransformation되어 최종적으로 taxol의 생산을 증대시키는가를 확인하고자 하였다.

Table 1에 요약한 바와 같이 접종 후 0, 3, 6일째에 각각 0.2, 1, 5ppm이 되도록 외부공급한 taxol은 자체적인 taxol 생산을 자극하는 효과보다는 억제하는 효과가 더 컸다는 것을 알 수 있었으며, 오히려 baccatin III의 생산을 가장 자극한 것으로 보아 외부에서 공급된 taxol이 세포내·외에 존재하는 여러 분해효소에 의해 그 구조를 유실하게 되어 taxol 구조에서 13번 탄소에 연결된 side chain을 잃은 baccatin III로 되어 농도가 증가되었다고 생각할 수 있다.

Table 2와 Table 3에는 외부에서 공급한 baccatin III와 cephalomannine의 영향을 정리하였는데 이들 물질도 외부공급한 taxol과 마찬가지로 taxol의 생산을 자극하는 효과는 보이지 못하였다. 이는 외부에서 공급된 baccatin III와 cephalomannine이 세포가 보유하는 분해효소에 의해 구조를 유실하게 되어 biotransformation을 위한 전구체의 역할을 수행하지 못하였을 가능성과 처음부터 세포내로 흡수되지 못하였을 가능성을 생각할 수 있다. 그러나 외부에서 공급된 baccatin III와 cephalomannine은 각각 10-deacetyltaxol과 7-epi-10-deacetyltaxol의 생산을 상당히 증대시킨 것으로 보아 전구체의 공급에 의해 좀더 taxol의 구조와 유사한 구조의 물질로 biotransformation이 가능하다는 잠재적 가

Table 2. Effects of exogenous baccatin III on taxane production in *Taxus brevifolia* cultures :difference (numbers in box)=[produced taxanes of treated flask(mg/L)/produced taxanes of untreated flask(mg/L)]-100; +, more than control ; -, less than control.

Treatment		Difference(% change from control)					
Time	Conc.	10-DAB	BCT	10-DAT	CPM	EDAT	TAXOL
Day0	0.2ppm	+20	-40	-20	-60	-30	0
Day3	0.2ppm	-50	+10	+210	+10	+40	+17
Day6	0.2ppm	+90	-10	+20	+20	-40	-34
Day0	1ppm	-40	-30	+10	-50	-95	-25
Day3	1ppm	-10	0	+250	+10	-50	+33
Day6	1ppm	-20	+10	+200	0	-40	0
Day0	5ppm	-60	+80	+150	-40	-80	-25
Day3	5ppm	-60	+90	+320	+20	-20	+17
Day6	5ppm	+110	+90	+180	-10	-40	-32

Table 3. Effects of exogenous cephalomannine on taxane production in *Taxus brevifolia* cultures :difference(numbers in box)=[produced taxanes of treated flask(mg/L)/produced taxanes of untreated flask(mg/L)]-100; +, more than control ; -, less than control.

Treatment		Difference(% change from control)					
Time	Conc.	10-DAB	BCT	10-DAT	CPM	EDAT	TAXOL
Day0	0.2ppm	+10	+50	-20	-70	+50	+10
Day3	0.2ppm	-20	+30	-10	-20	+110	-27
Day6	0.2ppm	-20	+60	-60	-20	+80	-20
Day0	1ppm	0	+70	+30	-60	+100	-20
Day3	1ppm	-10	+60	+20	-20	+100	-29
Day6	1ppm	-20	+50	+40	-10	+30	-29
Day0	5ppm	-30	+20	-50	-70	+20	-40
Day3	5ppm	-10	+60	+30	-20	+90	-20
Day6	5ppm	0	+70	+40	+20	+30	+10

능성을 제시하였다.

한편 외부에서 taxol이나 baccatin III, cephalomannine을 공급했을 때에 이들의 공급시기와 처리 농도에 따라 unknown peak가 작은 높이의 peak에서 매우 큰 높이의 peak까지 넓은 농도범위로 생성되었지만 현재 보유하고 있는 taxane mixture standard에는 포함되어 있지 않은 peak여서 구조를 확인할 수는 없었다. Fig. 4는 taxane mixture standard의 전형적인 chromatogram을 보여주고 있다. 이에 비해 외부에서 taxol을 공급하였을 때 얻은 chromatogram인 Fig. 5에서 볼 수 있듯이, 여러 가지 확인 미상의 peak들이 발견되지만 그 중에서는 taxol의 retention time 이후에 나타나는 unknown peak의 변화가 가장 크게 나타났다.

이상의 결과로부터 정확한 변환 경로를 알 수는

없지만 유사구조간의 상관관계가 있음을 확인하였고, 세포배양의 경우 미지의 peak의 변화가 많아 좀 더 깊이 있는 연구가 필요하다고 사료된다.

요 약

Diterpenoid 생합성의 중요한 전구체인 geranylgeranyl pyrophosphate의 공급을 위해 외부에서 geraniol을 넣어 주었을 때 taxol을 포함한 일부 taxane의 생산이 증대됨을 알 수 있었다. 또한 투여시기와 투여량에 따라 결과가 크게 변화하였다. Camphor와 menthol은 taxol과 같은 terpenoid 계열의 물질이지만 외부에서 공급하였을 때에는 taxol 생산을 증대시키는 효과는 없었다. 외부에서 인위적으로 taxol과 cephalomannine, baccatin III를 공급

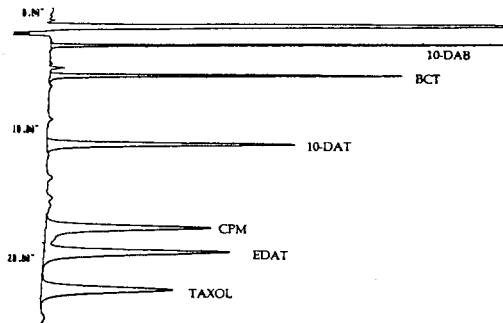


Fig. 4. High performance liquid chromatography (HPLC) chromatogram of standard mixture solution of taxol and related taxanes: 10-DAB, 10-deacetyl-baccatin III; BCT, baccatin III; 10-DAT, 10-deacetyl-taxol; CPM, cephalomannine; EDAT, 7-epi-10-deacetyl-taxol. The unit of retention time is minute.

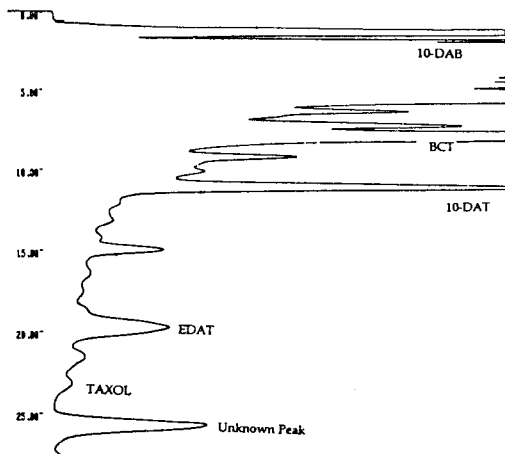


Fig. 5. Confirmation of unknown peak in a culture with exogenous taxol.

했을 때 모든 경우에서 taxol 생산은 자극받지 않았으며 taxol을 공급했을 경우에는 baccatin III의 생산이, cephalomannine을 공급했을 경우에는 7-epi-

10-deacetyl-taxol의 생산이, 그리고 baccatin III을 공급했을 경우에는 10-deacetyl-taxol의 생산이 각각 가장 많이 증대하였다.

감 사

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비(생물 화학공학)에 의하여 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantemet, R. K. Guy, C. F. Clalborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, and E. J. Sorensen(1994), *Nature*, **367**, 630.
2. A. K. Panda, V. S. Bisaria, and S. Mishra (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 1052.
3. G. A. Strobel, A. Stierle, and F. J. G. M. van Kuijk(1992), *Plant Sci.*, **84**, 65.
4. A. G. Fett-Neto, S. J. Melanson, S. A. Nicholson, J. J. Pennigton, and F. DiCosmo(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 967.
5. V. Bringi, P. Kadkade, C. L. Prince, B. F. Schubmehl, E. J. Kane, and B. Roach(1995), US Patent, 5, 407, 816.
6. M. C. Wani, H. I. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail(1971), *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325.
7. A. R. Holton, C. Somoza, H. B. Kim, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. C. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile, and J. H. Liu (1994), *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1597.
8. A. G. Fett-Neto, W. Y. Zhang, and F. DiCosmo(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 205.