

주목세포 배양에 의한 (10-Deacetyl) Baccatin III 생산 연구

유 병 삼 · 문 원 종 · 김 진 · 김 동 일 · † 변 상 요
아주대학교 공과대학 화학 · 생물공학부 ¹인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 1997. 11. 14., 게재승인 : 1998. 1. 23.)

Studies on the Production of (10-Deacetyl) Baccatin III in Cell Cultures of *Taxus baccata* Pendula

Byoung Sam Yoo, Won Jong Moon, Jean Kim, Dong-Il Kim¹, and Sang Yo Byun[†]

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

¹Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 1997. 11. 14., Accepted : 1998. 1. 23)

Enhanced production of (10-deacetyl) baccatin III and related taxanes was observed in suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula. six % of initial glucose and sucrose concentration increased 10-deacetyl baccatin III production 3.5 and 2.5 times, respectively. Methyl jasmonate, as an elicitor, increased taxane production. Time course changes of taxane production after methyl jasmonate addition showed that baccatin III and 10-deacetyl baccatin III were detected first and paclitaxel, 10-deacetyl taxol and cephalomanine were produced in sequence. Feeding experiments with 500 μ M of benzoic acid increased 10-deacetyl baccatin III production 10 times. Baccatin III production was also increased 8 times by feeding of 500 μ M of lysine as a precursor.

Key Words : baccatin III, 10-deacetyl baccatin III, paclitaxel, *Taxus baccata*, elicitor, precursor feeding

서 론

Baccatin계 화합물인 10-deacetyl baccatin III 와 baccatin III 은 탁월한 항암 효과를 보이는 taxol과 TaxotereTM 합성의 초기물질로서 사용하고 있으며, 유립주목등의 잎으로부터 생산되는 non-alkaloidal diterpenoid계통 물질로 보고되었다(1, 2). 주목에는 독성을 나타내는 taxine계 alkaloid 화합물이 많이 함유되어 있다. Taxine 계통의 alkaloid 화합물이 주목의 독성에 관여하는 것으로 알려져 있으며 1958-1965년 동안에 Lythogoe와 Nakanishi의 연구팀에 의하여 광범위하게 조사되었다(3). 그 이후에도 taxine 계통의 alkaloid 화합물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 분리의 어려움과 물질 특성의 불안정성으로 인하여 지금까지 taxine A와 taxine B의 두가지 성분만이 구조적으로 규명되어 있을 뿐이다. 또한 때로는 치명적일 수 있는 taxine 계통의 화합물에 대해 임상학적으로 알려진 바가 거의 없으므로 화학적 고찰 및 toxicology 측면에서도 관심이 점점 증가하고 있다. 그리하여 주목의 부위에 따른 종자, 잎, 줄기 및 껍질로부터 지금까

지 규명된 두 종류의 taxine과 유사한 구조의 alkaloid와 최근에 태평양 주목(*Taxus brevifolia* Nutt.)에서 알려진 brevifoliol의 유사구조를 가진 화합물에 대해 활발한 연구가 진행되고 있다(4). 이 taxine 계통의 alkaloid 화합물의 기본구조는 크게 tricyclic diterpenoid ring system과 2-dimethylamino-2-phenyl -propanoic acid의 ester 결합 형태로 존재하는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 구조의 taxane계 화합물에는 taxine-I, taxagifine, baccatin-V, baccatin III, taxol 등 여러가지가 있다. Taxane계 화합물중 taxol이 임상 실험 결과 유방암과 난소암에 대해 매우 탁월한 항암 효과를 발휘한다는 사실이 알려지게 되었다. 1980년대 중반에 taxol은 태평양 주목(*Taxus brevifolia*)의 껍질에서만 존재하는 것으로만 생각되었다. 그 이후 주목과(Taxaceae) 주목속(Taxus)에 포함된 여러 종류의 주목을 광범위하게 채집하여 분석한 결과 다른 종류의 주목 부위에서도 taxol 및 taxol에 관련된 여러 화합물이 검출되었으며 식물 세포배양 기술과 주목으로부터 추출 가능한 taxol 전구물질인 10-deacetyl baccatin III 를 이용하여 taxol을 합성하는 반합성(Semisynthesis)분야에서 이들의 분리 및 이용에 대한 관심이 증가하고 있다(5). Taxol 유도체 화합물들은 적절한 화학적 전환을 통하여 taxol 생산의 원료로 이용될 수 있으며 또한 구조와 활성에 대한 연구로부터 taxol 유도체의 공급원으로 이용될 수 있다(6, 7, 8). 최근의 연구결과에 의하면 100개 이상의 taxane diterpenoid(또는 taxoid)가 알려져 있으며 계속적으로 새로운 taxol 유도체 화합물이 보

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea
Tel : 0331-219-2451, Fax : 0331-216-8777
e-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

고되고 있다(9, 10, 11). Shuler *et al.*(12)의 연구에 의하면 paclitaxel의 pathway로서 확실히 전체적으로 알려진것은 없지만 부분적으로 증명된 것을 토대로 미루어 보면 paclitaxel의 side chain과 baccatin ring 부분을 나누어 크게 두 pathway로 구분될 수 있다. 이 두 pathway에 관련된 여러 가설을 통하여 baccatin III로부터 paclitaxel로의 생합성 과정을 설명하고 있다.

주목으로부터 paclitaxel을 직접 추출하지 않고 paclitaxel을 대량으로 공급할 수 있는 대체방안으로는 유기합성과 식물 세포 배양에 의한 paclitaxel의 생산으로 나눌 수 있다. 유기 합성의 경우 paclitaxel의 구조가 복잡하고 분자량이 크기 때문에 전합성에는 고비용 저수율등의 문제점이 있다. 현재 실용화되고 있는 합성 방법에는 주목 잎에 존재하는 paclitaxel 전구체인 10-deacetyl -baccatin III 에 paclitaxel side chain을 화학결합시켜 paclitaxel을 반합성하는 공정이 보고되고 있다. Paclitaxel의 side chain을 합성하는 방법과 baccatin III 와 paclitaxel side chain을 결합하는 방법에 대해 많은 보고가 있다. 그러나 주목의 잎으로부터 baccatin III 을 공급받는 과정에 어려움이 따르며 최근의 보고에 의하면 baccatin III 의 함량이 이전에 보고된 함량보다 적다고 알려져 재평가가 이루어지고 있다. 최근에는 전합성에 대한 성공 사례가 발표되고 있으나 약 30개의 반응 과정을 거쳐야 하는 등 경제성에는 아직 한계가 있는 것으로 알려져 있다(7, 13). 이와같은 상황으로 보아 식물 세포배양이 경제성을 갖고 paclitaxel을 대량 공급할 수 있는 하나의 방법이라고 할 수 있다. 최근에 태평양 주목의 세포배양으로부터 paclitaxel과 paclitaxel 유도체의 생산이 보고되었고 지속적인 연구가 활발하게 진행되고 있다(14, 15). 그러나 세포배양에 의한 paclitaxel 생산에도 생산시스템의 불안정과 낮은 생산성 등의 단점이 있다. 즉, 오랜 기간의 연구로 인해 생산성이 높은 세포주(cell line)를 얻어도 여러 번 계대배양 후에는 식물세포 유전자의 높은 가변성에 의해 생산성을 잃어버리는 경우가 많아 산업화에 어려움을 주고 있다. 또 주목세포는 성장이 느리고, 생산되는 paclitaxel 양이 다른 paclitaxel 유도체에 비해 상대적으로 적다(16).

Paclitaxel 유도체인 baccatin III와 10-deacetyl baccatin III 물질들은 반합성 과정을 통하여 paclitaxel로 쉽게 전환시킬 수 있다. 또한 다른 taxane들에 대한 약리 효과가 계속해서 밝혀지고 있기 때문에 이들의 가치 또한 계속 높아지고 있다. 결론적으로 세포 배양에서는 paclitaxel 뿐만 아니라 (10-deacetyl) baccatin III와 같은 유도체들의 가치도 고려해야 한다. 본 연구의 목적은 paclitaxel 반합성에 손쉽게 이용될 수 있는 baccatin III, 10-deacetyl baccatin III를 식물세포배양에 의해 외부환경의 영향을 받지 않고 지속적이면서 안정적으로 생산하고자 한다. 다양한 이차대사산물 생산 증진 기술을 이용하여 baccatin III, 10-deacetyl baccatin III의 생산성을 증가시키는 최적 조건에 대하여 연구하였다. 또한 baccatin III 및 paclitaxel의 metabolic pathway는 전체적으로 확실히 밝혀지진 않았지만, 부분적으로 증명된 사실이나 가설을 통하여 이들 pathway에 관련된 전구체나 중간생성물들을 세포배양에 적용하여 (10-deacetyl) baccatin III 및 paclitaxel의 생합성을 증진시키는 연구를 하였다.

재료 및 방법

세포 배양 : 본 연구에 이용된 세포주는 1992년 미국 Rutgers

대학 부설 농업시험장에서 분양 받은 유럽 주목(*Taxus baccata* Pendula)의 줄기와 잎으로부터 유도되었으며 25°C, 암 조건에서 계대 배양 하였다. 캘러스 및 현탁 배양 배지로 SH(Schenk & Hildebrandt)배지를 이용하였으며, 탄소원으로 1.5% sucrose, 0.5% glucose, 성장조절제로 NAA 5 µM, BAP 0.5 µM을 첨가 하였다. 배지의 pH는 1N KOH와 1N HCl을 이용하여 멸균전에 5.8로 적정하였다. 현탁 배양은 100mL 배양 배지가 든 250mL 삼각플라스크와 200mL 배양배지가 든 500mL 삼각플라스크를 120rpm 회전교반기에서 유지하였으며 7-10일 간격으로 계대배양하였다. 또한 캘러스배양은 약 20-30일 주기로 계대 유지 배양 중이다. 삼각플라스크 회분 배양 실험은 현탁 배양으로서 50mL 삼각플라스크에서 액체 배지를 각각 20mL 씩 넣고 세포를 접종하여 회전교반 배양기에서 120 rpm으로 진탕 배양하였다. 접종 세포는 500mL 삼각플라스크에서 배양 유지하던 대수 증식기 중기의 세포를 이용하였으며 접종량은 20%(w/v)로 하였다.

시약 : Paclitaxel 및 taxane 표준물질은 미국 NCI의 Ken Snader 박사로부터 공급 받았으며 주목의 배지 제조에 사용한 시약 및 식물호르몬, casein enzymatic hydrolysate, polyvinylpyrrolidone은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였다. Paclitaxel 및 taxane 분석에 이용한 전개용매인 H₂O, acetonitrile 및 methanol은 Fisher Scientific Co.(Rochester, NY, U.S.A.)의 HPLC grade 제품을 이용하였다.

분석 : 당농도를 분석하기 위하여 배지를 0.45 µm, 13mm membrane filter(Baxter Scientific Products)로 여과한 뒤 HPLC를 이용하였다. Detector는 RI detector(Showa Denko K.K., Japan)를 사용하였고 분리 column으로 carbohydrate analysis column(Waters, U.S.A.)이나 IB-Sil (Phenomenex, U.S.A.)을 사용하였다. 전개용매로 acetonitrile과 H₂O을 80:20(v/v)의 비율로 혼합하여 사용하였으며 유속은 2 mL/min으로 유지하였다. 세포량은 배양된 세포의 fresh cell weight(FCW)와 dry cell weight(DCW)를 측정하여 세포생장을 측정하였다. FCW는 배양 세포를 진공펌프를 이용하여 Whatman No.1 여과지로 여과하여 수분을 제거한 후 배지와 세포를 분리시켜 g/L 단위로 측정하였다. DCW는 위에서 여과한 세포를 60°C 건조기에서 30시간 이상 건조하여 g/L 단위로 측정하였다.

Taxane 함량은 세포내 함량과 배지에 존재하는 세포외 함량으로 구분하였다. 세포내 함량은 fresh cell에 methanol을 가하고 초음파 파쇄하여 추출한 뒤 methylene chloride(MC)와 물을 (1:1, v/v) 이용해 partitioning하여 수용액 층을 제거한 후 MC를 진공 감압하여 제거하였다. 다시 methanol로 추출하여 0.45 µm, 13mm membrane filter(Baxter Scientific Products, U.S.A.)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 배지에 존재하는 taxane은 일정량의 배지를 MC와 1:1로 partitioning하여 MC를 진공 감압한 후 methanol로 녹여 여과후 분석하였다. 주목 세포배양에서 생성된 paclitaxel 및 유도체 taxanes 분석 방법으로 HPLC system을 이용하였다(Spectra System P4000 pump, UV3000 detector). Taxane분석에는 ES Industries(Marlton, NJ, U.S.A.)로부터 구입한 reversed phase pentafluorophenyl(PFP) HPLC column(4.6×250mm, 5 µ, 60 Å.)을 이용하였다. PFP column을 이용한 분석에서의 이동상은 H₂O와 acetonitrile을 62:38(v/v)로 25분간 일정한 비율로 유지한 후 10분간 linear

gradient로 57:43(v/v)으로, 다시 5분간 linear gradient로 55:45(v/v)로 유지하였다. 유속은 1.2mL/min, sample 주입량은 20 μ L로 유지하였다. 검색 파장은 228nm와 280nm를 이용하였다.

결과 및 고찰

현탁 배양 세포의 시간에 따른 세포 성장과 (10-deacetyl) baccatin III의 관계를 알아보기 위하여 삼각플라스크 회분배양 실험을 하였다. 그 결과 Figure 1과 같이 시간의 변화에 따른 세포 성장과 (10-deacetyl) baccatin III 생성 곡선을 얻었다. Lag phase는 거의 나타나지 않았고 배양 7일 후인 대수증식기 말기에 DCW는 최고값인 12.25 g/L이었고 그 후 점차적으로 감소하였다. 탄소원으로 glucose와 sucrose를 이용하였는데, sucrose는 glucose와 fructose로 빠르게 가수분해되어 3일째에 모두 소모되었다. 당의 소모속도 변화를 살펴보면 fructose에 비해 glucose의 소모가 더 빠르게 일어나며, 이후 glucose와 fructose도 배양 6일후에는 모두 소모되었다(자료생략). 생성된 10-deacetyl baccatin III는 세포내 함량이 배지내 함량보다 많았는데 생성량이 증가하여 5일째에 가장 많았고 점차 감소하는 결과를 보였다. Baccatin III는 1일 부터 7일 사이에 생성이 증가되고 이후 감소하는 것으로 나타났는데 배지로 분비되는 양이 세포내의 양보다 많았다. Paclitaxel은 12일 이후부터 생성되기 시작하다 22일에 최대값을 보인후 감소하는 결과를 보였다.

초기 당농도가 세포 성장과 (10-deacetyl)baccatin III 생성에 미치는 영향 : 탄수화물은 세포의 성장과 세포 성장을 저해하는 것으로 알려진 phenol계 화합물의 생합성에 이용된다. 탄수화물 중 sucrose, glucose, fructose가 식물세포 배양에서 널리 이용되고 있으며, 본 실험에서는 각각의 탄소원의 초기농도에 따른 세포 성장과 (10-deacetyl) baccatin III 생산성 변화를 실험하였다. 각각의 탄소원의 농도를 1.4, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10%로 변화시킨 40mL SH 배지를 100mL 삼각플라스크에 넣고 멸균한 후 *Taxus baccata* FCW 8g을 접종하여 배양한지 3일 후에 추출하여 분석하였다. 탄소원과 탄소원의 농도에 따라 (10-deacetyl) baccatin III 생성 경향과 최적 농도가 다르게 나타났다.

초기 fructose 농도가 세포 성장과 (10-deacetyl)baccatin III

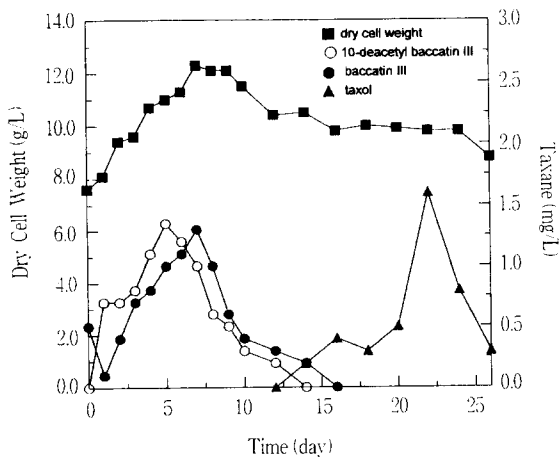


Figure 1. Kinetics of cell growth and taxane production.

생성에 미치는 영향을 보았다. Fructose 농도가 높아짐에 따라 세포 생장은 감소하였고 pH 변화는 없었다. 10-deacetyl baccatin III의 생성량은 세포내 함량이 배지내 함량보다 많았고 fructose 농도가 높을수록 점점 감소하는 경향을 볼 수 있었다. Baccatin III는 배지로 분비되는 양이 세포내의 양보다 많았고 2%에서 약간 증가하였지만 전체 생성량은 10-deacetyl baccatin III보다 적었다(자료생략). Fructose는 세포 성장 및 (10-deacetyl) baccatin III 생산에 적합하지 않았다. Glucose의 경우, 농도가 높아짐에 따라 세포 생장은 감소하였고 pH 변화는 없었다 (Figure 2). 10-deacetyl baccatin III는 5%부터 생성이 급격하게 증가하였는데 주로 세포내 생성량이 증가하였고 8% 이후 감소하였다. Baccatin III는 8%에서 최대값을 보였다. Sucrose의 경우도 농도가 높아짐에 따라 세포 생장은 감소하였고 pH는 거의 일정하였다(Figure 3). 10-deacetyl baccatin III는 sucrose 농도 6%에서 세포내의 생성량이 4.7mg/L로 가장 많았고 배지 내에서는 거의 존재하지 않았다. Baccatin III도 sucrose 농도 6%에서 배지 내의 생성량이 가장 많았다. Fructose와 비교하여 이들 두 당(sucrose, glucose)은 10-deacetyl baccatin III production 배지로 이용될 수 있는 가능성이 많음을 알 수 있었다.

Elicitor가 (10-deacetyl) baccatin III 및 taxane 생성에 미치는 영향 : (10-deacetyl) baccatin III 생산성 증가에 영향을 줄 수 있는 elicitor를 찾기 위하여 다음의 다양한 elicitor를 세포배양에 적용하였다. *T. baccata* 현탁배양 세포 8g을 40mL SH배지를 넣은 100mL 삼각 flask에 접종하고 3일 후에 yeast extract elicitor, *Phytophthora megasperma* extract elicitor, methyl jasmonate, CuSO₄, K₃PO₄, AgNO₃를 cold filtration 방법으로 멸균한 뒤 각각 100 μ g elicitor/g FCW으로 투여하여 1일후에 추출하여 분석하였다. 여러 elicitor 중 methyl jasmonate를 투여시 세포 생장은 감소하였지만 (10-deacetyl) baccatin III는 대조구보다 증가하였다. 우수한 elicitor로 methyl jasmonate를 선택하였으며 methyl jasmonate의 최적 투여 농도를 찾는 실험을 하였다.

Methyl jasmonate는 jasmonic acid의 전구물질이다. Jasmonic acid는 최근 식물세포 외부로부터의 signal transduction 기작

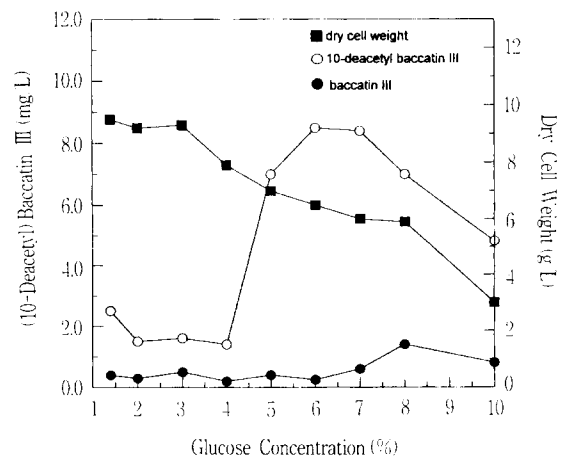


Figure 2. Glucose effect on cell growth and (10-deacetyl) baccatin III production.

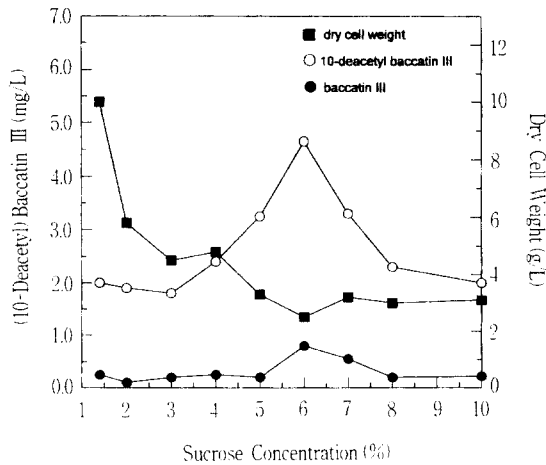


Figure 3. Sucrose effect on cell growth and (10-deacetyl) baccatin III production.

과정의 중요 매개체로 알려진 물질로서 여러 식물세포 배양의 elicitor로 좋은 효과를 나타내고 있다. 100mL 삼각플라스크에 40mL SH 배지를 넣고 *T. baccata* FCW 6g을 접종하여 배양한지 4일 후에 methyl jasmonate를 50, 100, 200, 300, 400 μ M을 투여하고, 투여 1일 후에 추출하여 분석하였다. pH는 농도에 관계없이 일정하였고 세포생장은 농도가 증가함에 따라 대조구에 비하여 50, 100 μ M에서 급격히 감소하여 갈색을 나타내기 시작했다. 10-deacetyl baccatin III의 생성은 50 μ M에서 최대치를 보였는데 이는 대조구에 비하여 4.5배 증가한 값이었다 (Figure 4). 100 μ M에선 약간 감소하는 경향을 보이다가 200 μ M 이상에선 급격히 생성이 감소하였다. Baccatin III의 경우는 50 μ M에서도 생성이 증가하다가 100 μ M에서 최대치를 보였고 200 μ M 이상에선 감소하는 결과를 보였다. Methyl jasmonate 100 μ M 투여시 생성된 baccatin III 최대치는 대조구에 비하여 7.5배 증가한 값이었다. 이러한 결과로 보면 (10-deacetyl) baccatin III 생성을 증가시키는 methyl jasmonate의 최적 농도는 100 μ M로 고려되며 추후 elicitor 실험에는 이 농도를 적용하였다.

Methyl jasmonate elicitation에 의한 (10-deacetyl) baccatin III와 각 taxane의 시간별 생성 경향을 파악하기 위한 실험을 하였다. 100mL 삼각플라스크에 40mL SH 배지를 넣고 *Taxus baccata* FCW 6g을 접종하여 배양한지 4일 후에 methyl jasmonate를 100 μ M을 투여하고, 시간별로 추출하여 분석하였다. 현탁배양 중인 세포의 색은 6시간이후부터 갈색을 띠기 시작하여 세포량은 시간이 지날수록 감소하였다. Figure 5는 methyl jasmonate 투여후 (10-deacetyl) baccatin III을 포함한 여러 taxane들의 시간에 따른 생성 패턴을 보여준다. Baccatin III와 10-deacetyl baccatin III는 투여후 1일 까지 생성이 증가하다 그 이후부터 감소하는 경향을 보인다. 이들은 taxane 생성 metabolism에서 중간생성물로 인정되고 있기(12) 때문에 생성 및 소비에 의한 관례로 증가후 감소하는 경향을 보이는 것으로 고려된다. Paclitaxel은 1일 이후부터 생성이 증가하기 시작하여 3일에 최대치를 보이고 감소하는 경향을 보인다. 10-deacetyl taxol은 elicitor 투여후 생성이 서서히 증가하다 6일에 최대치를

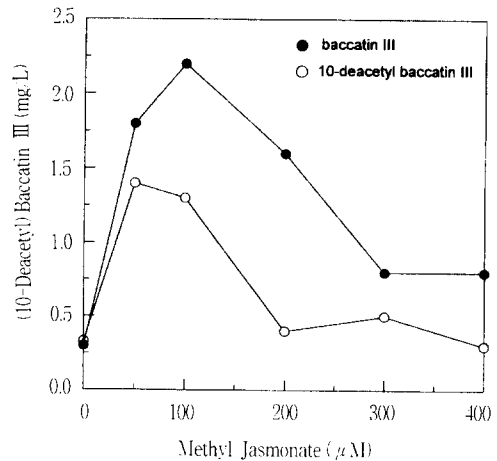


Figure 4. (10-Deacetyl) baccatin III production at various methyl jasmonate concentration.

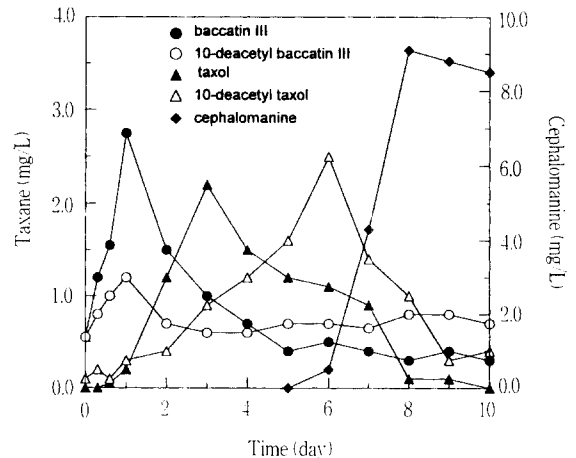


Figure 5. Elicitation kinetics of various taxane.

보이고 감소하였다. Cephalomanine은 5일 이후부터 생성되다가 6일 이후부터 급격히 증가하여 8일에 최대값을 보이고 완만하게 감소하였다. 이 실험결과에 의하면 paclitaxel도 (10-deacetyl) baccatin III처럼 taxane metabolic pathway 상의 중간생성물로 고려된다. 이는 그동안 연구발표된 결과와 많은 차이를 보이는데 기존의 연구결과에는 paclitaxel을 최종생합성물로 고려되고 있었다. 따라서 주목 세포배양에서 paclitaxel은 적절한 시간에 샘플링하여 분석하지 않으면 그것의 생성을 알 수 없을 것으로 고려되며, 또한 세포배양에서 paclitaxel의 생성을 극대화하기 위해서는 적절한 시간에 배양세포를 수확하는 것이 필요할 것으로 고려된다.

(10-deacetyl) baccatin III 및 paclitaxel 생합성 연구 : Paclitaxel의 pathway로서 확실히 전체적으로 알려진 것은 없다. 현재까지 부분적으로 증명된 것과 여러 가설을 토대로 미루어 보면 paclitaxel의 생합성은 side chain pathway에서 생성된 side chain 전구체와 baccatin ring pathway에서 생성된 carbon 전구체의 합성으로 이루어 진다(12). 따라서 각 pathway를 구

성하고 있는 전구체 또는 중간생성물질들은 (10-deacetyl) baccatin III 뿐 아니라 taxane 생합성에 큰 영향을 미칠 수 있다. Paclitaxel의 경우 방사성 동위원소 방법으로 확인되고 그 투여효과가 알려진 전구체로서 phenylalanine과 acetate 가 있으며 나무에 이를 이용하여 생산을 증가시킨 경우도 있다. 그러나 이는 나무에 투여한것이기 때문에 세포배양의 경우는 다른 농도의 다른 투여방법이 필요하다. 본 연구에서는 위의 자료를 근거로 하여 세포배양방법에 의한 전구체 투여 실험을 수행하였다. 먼저 특이성이 있는 전구체를 찾기 위하여 paclitaxel 생합성의 전구체로서 또는 중간물질로서 가능성이 있는 여러 물질들을 투여하여 보았다. 이때 전구체 만으로는 증진효과가 뚜렷하지 않을 것으로 예상되므로 생산에 영향을 주는 것으로 밝혀진 elicitor로 methyl jasmonate를 동시에 투여하였다. 100mL 삼각 flask에 배지 40mL를 넣고 *T. baccata* FCW 6g를 접종하여 배양 4일 후 elicitor와 전구체를 같이 투여하였다. methyl jasmonate 100 μM을 투여하고 phenylalanine, ferulic acid, benzoic acid, lysine, sodium acetate, tyramine, glutamine, abscisic acid, lauric acid를 각각 100 μM 투여 한지 12시간 후 추출하여 분석하였다(Figure 6).

Phenylalanine는 생성 경로상에서 paclitaxel 생산에 매우 적합한 전구체라 여겨지고 있고 ferulic acid는 변형된 shikimate pathway상에서 phenylalanine과 유사한 구조로 paclitaxel생성에 영향을 주는 것으로 알려져있는 물질이지만 이번 실험에서는 전체적으로 각 taxane 생성에 큰 영향이 없었고 유도체 생성 증가가 나타났지만 methyl jasmonate elicitation의 효과에 의한 것으로 생각되고 precursor에 의한 효과는 나타나지 않았다. Tyramine, sodium acetate, abscisic acid, glutamine를 투여했을 때 유도체의 생성 증가 효과는 거의 나타나지 않았고 glutamine을 투여했을 때 세포 생장이 증진되었다. Lauric acid를 투여한 경우 7-epi-10-deacetyl taxol이 대조구보다 10배 증가하였고 다른 유도체들에 대해서는 효과가 거의 없었다(자료생략).

Benzoic acid는 각 유도체에 대하여 생성 증가 효과가 있었으며 특히 baccatin III에 대하여 대조구보다 13배 이상 증가하였고 생산된 baccatin III는 대부분 배지내로 방출되었다(Fig.6). 이는 benzoic acid가 baccatin ring pathway에서 carbon 전구

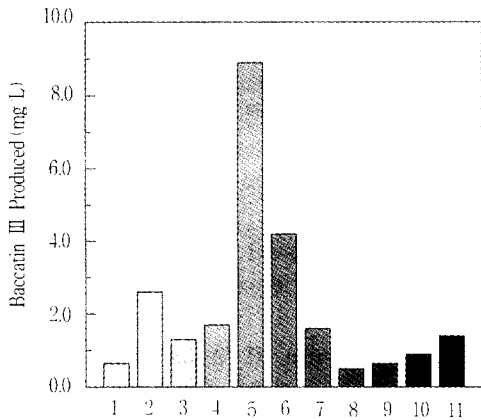


Figure 6. Baccatin III production with 1:control, 2:elicitor, 3: phenylalanine, 4:ferulic acid, 5:benzoic acid, 6:lysine, 7:tyramine, 8:sodium acetate, 9:abscisic acid, 10:glutamine, 11:lauric acid.

체로 작용하고, 항산화작용이 있기 때문에 baccatin III가 축적된 것으로 생각된다. Benzoic acid 투여 최적농도 실험을 하였다. 100mL 삼각flask에 배지 40mL를 넣고 *T. baccata* FCW 6g를 접종하고 배양 4일 후 methyl jasmonate 100 μM과 precursor로 benzoic acid를 각각 10, 50, 100, 300, 500, 1000 2000 μM 투여하고 12시간 후 추출하여 분석하였다. Benzoic acid 투여 농도가 증가함에 따라 세포량은 약간 감소하였고 pH 변화는 거의 없었다. 10-deacetyl baccatin III는 세포내 함량이 배지보다 많았으며 methyl jasmonate 100 μM만 투여한 대조구보다 10배이상 증가하였다(Figure 7). Baccatin III는 세포와 배지내 함량이 100 μM에서 증가하기 시작하여 300 μM에서 가장 많았고 이후 급격히 감소하였다. 10-deacetyl taxol, cephalomanine, 7-epi-10-deacetyl taxol 모두 100 μM에서 증가하여 500 μM에서 각각의 생성량이 가장 많았다.

Lysine도 역시 각 유도체에 대하여 생성 증가 효과가 있었으며 특히 baccatin III에 대하여 총 생성량은 대조구보다 8배 이상 증가하였고 생산된 baccatin III는 대부분 배지내로 방출되었고 specific baccatin III content(% of DCW)은 15배 증가하였

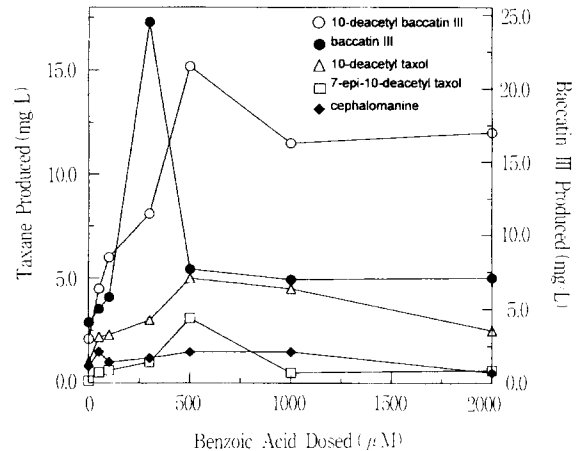


Figure 7. Taxane production at various benzoic acid concentration.

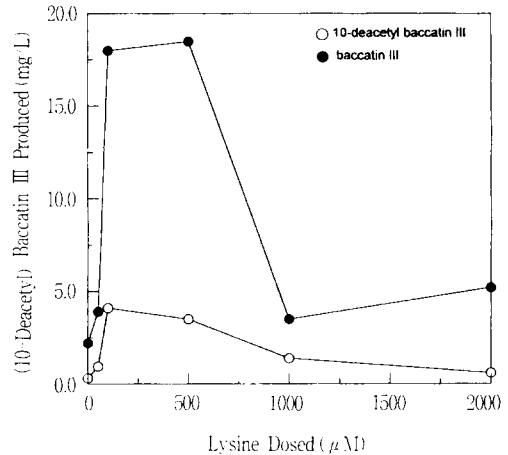


Figure 8. (10-Deacetyl) baccatin III production at various lysine concentration.

다(Figure 8). 10-Deacetyl baccatin III에 대해서도 우수한 효과를 나타내었고, 다른 전구체에서는 생성되지 않은 cephalomanine의 생성도 관찰되었다. 이는 lysine이 carbon 전구체와 영양분으로 작용했기 때문인 것으로 생각된다. Lysine 투여 최적농도 실험을 하였다. 실험방법은 benzoic acid와 같았다. Lysine 투여 농도가 증가함에 따라 세포량은 약간 감소하였지만 큰 차이는 없었고 pH변화도 거의 없었다. 10-deacetyl baccatin III는 benzoic acid를 투여했을 때와는 달리 배지내 함량이 세포보다 많았으며 100 μ M에서 약간 증가하기 시작하였다(Fig.8). Baccatin III는 배지내 함량이 100 μ M에서 급격히 증가하기 시작하여 500 μ M에서 18 mg/L로 대조구 보다 8배까지 증가한 후 감소하였다.

Baccatin III를 세포배양에 직접 투여하여 paclitaxel 생합성에 미치는 영향을 살펴보았다. 실험방법은 다른 전구체 투여와 같았다. 그러나 baccatin III의 외부투여시 paclitaxel 생합성에 별다른 영향을 미치지 못하였다. Paclitaxel 생합성 과정에서 baccatin III의 역할에 대한 여러 가설이 있다(12). 직접적인 전구체로서 baccatin III 생산에 영향을 주면 반드시 paclitaxel 생산에도 영향을 주게 된다는 주장과 baccatin III가 전구체로 이용되지만 직접적인 전구체가 아니며 아직 밝혀지지 않은 paclitaxel 생합성 경로로 다시 들어간다는 가설이 발표되고 있다. 이러한 가설들은 본 실험 결과와 아무런 연관성을 보이지 못하는데 이는 이들 가설의 오류라기 보다는 paclitaxel 생합성의 특이성 때문이라 생각된다. Paclitaxel의 생합성을 증가시키기 위해선 baccatin III와 관련된 baccatin ring pathway의 활성화 뿐만 아니라 side chain pathway의 활성화도 동반 되어야 할 것 같다. Phenylalanine 투여는 side chain 생성 증가와 paclitaxel 생합성 증가에 별다른 영향을 미치지 못하였다. 이러한 side chain의 제한은 phenylalanine같은 전구체 양 때문이 아니라, side chain 합성에 관여하는 효소 때문인 것으로 보고 있다. 따라서 paclitaxel의 생합성을 증가시키기 위해선 본 연구에서 효과를 보인 (10-deacetyl) baccatin III 생성 증진 방법과 동시에 side chain 생성을 증가시키기 위한 방법의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

유럽주목(*Taxus baccata* Pendula) 현탁 세포 배양에서 (10-deacetyl) baccatin III 생산을 증진시키는 연구를 하였다. 높은 초기 당 농도가 (10-deacetyl) baccatin III 생성을 증가시켰다. 6%의 초기 포도당과 자당의 경우 10-deacetyl baccatin III 생산을 각각 3.5배와 2.5배 씩 증가시켰다. Baccatin III도 초기 포도당 8%에서, 초기 자당 6%에서 최대값을 보였다. 일리시터로서 methyl jasmonate는 (10-deacetyl) baccatin III 생산을 증가시켰다. 10-deacetyl baccatin III의 생성은 50 μ M에서 최대치를 보였는데 이는 대조구에 비하여 4.5배 증가한 값이었다. Baccatin III의 경우 methyl jasmonate 100 μ M에서 생성된 baccatin III 최대치는 대조구에 비하여 7.5배 증가한 값이었다. Methyl jasmonate elicitation에 의한 (10-deacetyl) baccatin III과 각 taxane의 시간별 생성 경향을 보면 baccatin III와 10-deacetyl baccatin III는 투여 후 1일 까지 생성이 증가하다가 후부터 감소하였고 paclitaxel, 10-deacetyl taxol 및

cephalomanine의 생성이 이어졌다. (10-deacetyl) baccatin III의 생합성을 증가시키기 위하여 전구 물질을 투여하였다. Benzoic acid를 500 μ M로 투여하였을 때 10-deacetyl baccatin III 및 baccatin III의 생산은 대조구에 비하여 각각 10배와 13배 증가하였다. Lysine도 500 μ M로 투여하였을 때 baccatin III의 생성량을 대조구 보다 8배 증가시켰다.

감 사

본 연구는 96년도 교육부 생물화공 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 연구비지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Nicolaou, K. C., C. Riemer, M. A. Kerr, D. Rideout, and W. Wrasidlo (1993), Design, Synthesis and Biological Activity of Protaxols, *Nature*, **364**, 464-466.
- Gueritte-Voegelein, F., V. Senilh, B. David, D. Guenard, and P. Potier (1986), Chemical Studies of 10-deacetyl baccatin III : Hemisynthesis of Taxol Derivatives, *Tetrahedron*, **42**(16), 4451-4460.
- Baxter, J. N., B. Lythogoe, B. Scales, R. M. Scowston, and S. Trippett (1962), Taxine. Part I. Isolation Studies and the Functional Groups of O-Cinnamoyltaxicin-I, *J. Chem. Soc.*, 2964-2971.
- Chu, A., L. B. David, J. Zajicek, N. G. Lewis, and R. Croteau (1993), Intramolecular Acyl Migrations in Taxanes from *Taxus brevifolia*, *Phytochemistry*, **34**(2), 473-476.
- Bringe, V. (1993), Phyton Catalytic Inc. Enhanced Production of Taxol and Taxans by Cell Cultures of *Taxus* Species, WO 93/17121.
- Holton, R. A., H. Nadizadeh, R. J. Beidiger, and K. Seokchan (1992), Substituted Taxanes as Antitumor Agents, European Patent 534709.
- Stella, J. V. and A. E. Mathew (1990), Derivatives of Taxol, Pharmaceutical Compositions thereof and Methods for the Preparation thereof, WO 9010443.
- Ashok, G. C. and D. G. I. Kingston (1993), Synthesis of 10-Deacetytaxol and 10-Deoxytaxotere, *Tetrahedron Letters*, **34**(31), 4921-4924.
- Beutler, J. A., G. M. Chmurny, S. A. Look, and K. M. Witherup (1991), Taxinine M, A new Tetracyclic Taxane from *Taxus brevifolia*, *J. Nat. Prod.*, **54**(3), 893-897.
- Huang, C. H. O., D. G. I. Kingston, N. F. Magri, and G. Samaranayake (1986), New Taxanes from *Taxus brevifolia*, *J. Nat. Prod.*, **49**(4), 665-669.
- Fuji, K., K. Tanaka, and B. Li, T. Shingu, H. Sun, T. Taga (1992), Taxchinin A: A Diterpenoid from *Taxus chinensism*, *Tetrahedron Letters*, **33**(51), 7915-7916.
- Srinivasan, V., V. Cidd, V. Bringi, and M. L. Shuler (1996), Metabolic Inhibitors, Elicitors, and Precursors as

- Tools for Probing Yield Limitation in Taxane Production by *Taxus chinensis* cell cultures, *Biotechnol. Prog.*, 12 (4), 457-465.
13. Schiff, P. B., J. Fant, and S. B. Horwitz (1979), Promotion of Microtubule Assembly in vitro by Taxol, *Nature*, 227, 665-667.
 14. McGuire, W. P., E. K. Rowinsky, N. B. Rosenshein, F. C. Grumbine, D. S. Ettinger, D. K. Armstrong, and C. R. C. Donehower (1980), Taxol: A Unique Antineoplastic Agent with Significant Activity in Advanced Ovarian Epithelial neoplasms, *Annals of Internal Medicine*, 77, 1561-1565.
 15. Parness, J. and S. B. Horwitz (1981), Taxol Binds to Polymerized Tubulin in vitro, *J. Cell Biol.*, 91, 479-487.
 16. Wickremesinhe, E. R. M. and R. N. Arteca (1993), *Taxus* callus cultures: Initiation, Growth Optimization, Characterization and Taxol Production, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35, 181-193.