생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
31(2) : 235 ~ 239 (2000)

형질전환시킨 갈퀴꼭두서니 세포의 색소생합성에 미치는 수종의 신호전달 cascade 관련물질의 효과

신승원,* 류 리
덕성여자대학교 약학대학

Effects of compounds related to signal transduction on anthraquinone biosynthesis in transformed cells of *Rubia cordifolia* var. *pratensis*

Seung-Won Shin* and Lee Lyu
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract – The effects of several compounds related to signal transduction cascade were determined to induce the production of alizarin and purpurin in the hairy root culture system of *Rubia cordifolia* var. *pratensis*. It was found that out of five tested compounds jasmonic acid(1 mg/l) and methyl jasmonate(1 mg/l) stimulated strongly the biosynthesis of the pigments while linolenic acid (1 mg/l) induced no significant increase of the product. Yeast extract(600 mg/l) and arachidonic acid(1 mg/l) showed relatively mild inducing effects on production of alizarin. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate were reduced by treatment with cycloheximide(2.8 mg/l).

Key words – *Rubia cordifolia* var. *pratensis*, hairy root, jasmonic acid, methyl jasmonate, alizarin, purpurin

갈퀴꼭두선이(*Rubia cordifolia* var. *pratensis* Max.)는 꼭두선이(*Rubia akane*)와 함께 한국의 중요한 천연 염료자원 식물로 평지나 야산등에는 꼭두선이보다 더욱 흔하게 자라고 있는 번식력이 강한 야생식물이다.[1,2] 이 식물의 뿌리에 함유된 유용한 anthraquinone계 색소성분인 alizarin및 purpurin 등의 합성법은 이미 염료합성역사의 초기에 개발되었으나 생활수준의 향상과 더불어 천연색소에 대한 요구는 급증하고 있다. 그러나 야생식물 뿌리에 함유된 색소는 미량으로 한정되어 있어 대량생산에 있어서의 경제성이 낮은 상태이므로 이 계통 천연색소의 보다 경제적인 생산법에 대해 이미 다방면으로 연구되고 있다.[3,4]

세포배양에 의한 색소생산법에 있어서 성분의 생산성을 제한시키는 중요한 요인에 해당되는 미생물에 비해 현저히 느린 식물세포의 분열속도와 인공배양 상태에서 일반적으로 낮은 이차대사산물의 생합성 효율을 증대시키 위한 방법 등이 연구되고 있는데, *Rubia*속 식물의 세포를 *A. rhizogenes*의 Ri plasmid로 형질전환시켜 유도된 hairy root[5]의 빠른 생장력을 이용한 배양 system에서 이 계통 색소의 생산효율을 높일 수 있다는 것이 보고된 바 있으며, 한편 Gundlach 등은 36종의 세포현탁배양에서, 식물이 미생물이나 곤충에 의해 공격을 받았을 때 식물 세포막에서 일시적으로 생산되는 대표적인 물질로 arachidonic acid cascade 관련 oxylipin 유도체인 jasmonate를 외부에서 첨가했을 때 phenyl alanine ammonia lyase 유전자의 *de novo* transcription을 initiate하여 관련 이차대사산물 축적이 증가되는 것을 보고했는데, 그 중 Rubia속 식물인 *Rubia tinctorum*의 세포배양에서 methyl jasmonate에 의해 유도된 rubiadin의 생성을 증가시킨다는 것을 확인한 바 있다.[6]

본 논문에서는 중요한 한국산 천연염료 자원식물인 갈퀴 꼭두서니의 세포에서 *A. rhizogenes*로 유도한 hairy root의 액체배양 system에서, 일반적으로 식물에서 각종 이차대산물에 대한 elicitation효과가 강한 것으로 알려져 있는 yeast extract를 처리하는 한편

*교신저자 : Fax : 02-901-8384

jasmonate의 생합성 관련물질인 linolenic acid, arachidonic acid, methyl jasmonate 및 jasmonic acid를 배지내에 첨가하여 시간에 따른 anthraquinone계 색소생산에 미치는 영향을 비교한 결과 jasmonic acid 및 methyl jasmonate 처리에 의해 색소 생산성을 현저히 높일 수 있다는 것을 확인하였기에 보고한다.

재료 및 방법

Hairy root의 배양 – 덕성여대 약초원에서 채취한 갈퀴꼭두선이(*Rubia cordifolia* var. *pratensis*)의 어린 줄기에 *A. rhizogenes* A_4를 접종하여 형질전환시켜 얻은 hairy root를 배양하여 재료로 하였다. 25°C, 광선차단 상태를 기본 배양조건으로 하였고, 배지는 α-naphthalene acetic acid를 0.1 mg/l 첨가한 Nitsch & Nitsch 고체배지를 사용하였다. Hairy root를 6주 간격으로 계대배양하고, 그중 안정한 생장속도를 나타내는 cell line을 선별하여 Nitsch & Nitsch 액체배지로 옮긴 후 앞에서와 같은 조건에서, 100±10 rpm으로 진탕하여 배양하였다.

***Agrogacterium rhizogenes*에 의한 갈퀴꼭두선이의 형질전환 확인** – 계대배양 중인 hairy root와 control로서 모식물인 갈퀴꼭두선이의 잎을 각각 유발에 넣고 liquid N_2을 가하여 미세분말로 만든 후, DNA Zol(Gibco)로 상법에 따라 DNA를 추출하고, ethanol로 DNA를 침전시키는 방법으로 정제한 후, 물에 용해하여 희석하여, 파장 260 nm와 280 nm에서 UV 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. 또한 *A. rhizogenes*의 Ri plasmid 중 rol gene sequence를 Gene bank database에서 검색하여 primer를 design하여 제조하였다. 추출한 DNA 100 ng을 template로 하여, 5'-primer 20 pmol, 3'-primer 20 pmol, 10X buffer 5 μl, dNTP 3 μl, 25 mM $MgCl_2$ 1 μl, γ-Taq polymerase 2U, H_2O등을 혼합하여 전체가 50 μl가 되게 만들어서 94°C에서 2분간 1 cycle, 94°C 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분간 40 cycle, 72°C에서 5분간 1 cycle을 polymerase chain reaction(PCR)시켰다. PCR products는 size marker와 함께 2% agarose gel plate에 load 하고 전기영동을 하여 ethidium bromide staining에 의해 rol gene 의 band를 640 bp에서 확인하였다.

Elicitor에 의한 색소 생합성 변화 측정 – Hairy root를 elicitor가 들어 있지 않은 액체배지에서 배양했을 때를 control로 하고. 한편 hairy root 배양액에 yeast extract 600 mg/l, linolenic acid 1 mg/l, arachidonic acid 1 mg/l, jasmonic acid 1 mg/l, methyl jasmonate 1 mg/l를 각각 따로 첨가하고, shaking incubator(100 rpm)에서 배양을 계속하면서 30분 간격으로 hairy root를 건져서 배지를 닦아낸 후 색소를 추출, 정량하여 그 결과를 비교하였다. 색소의 정량은 Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer를 사용하여, purpurin의 ethanol 용액의 농도에 따른 흡광도를 516 nm에서 각 농도에 따른 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 또한 농도에 따른 흡광도를 alizarin-ethanol 용액에 동량의 1N-NaOH 용액을 570 nm에서 측정하여 검량선을 작성하였다. 단백합성 저해물질인 cycloheximide(2.8 mg/l)에 의해 첨가한 elicitor 및 신호전달 관련물질들의 효과가 억제되는 가를 실험하기 위하여, 멸균된 cycloheximide용액을 무균실에서 배양 flask안에 주입하고 30분 후에 elicitor를 가한 다음, 위와 같은 방법으로 배양한 후 색소를 추출, 정량하여 비교하였다.

결과 및 고찰

Rubia cordifolia var. *pratensis*의 어린 잎과 줄기 세포에 *A. rhizogenes* A_4를 접종하여 형질전환시켜 얻은 hairy root에 2차대사를 elicitation 하기 위한 목적으로 이미 여러 식물에서 신호전달물질인 jasmonate의 유도효과가 있는 것이 증명된 yeast의 세포막 추출물, 식물세포에서 jasmonate 생합성 cascade에 관련물질로 알려진 linolenic acid, arachidonic acid를 처리한 후의 시간별 색소함량의 변화를 관찰하고 jasmonic acid 및 methyl jasmonate를 외부에서 직접 처리했을 때와 비교하였을 때, 실험에 사용한 elicitor는 모두 control에 비해 alizarin(Fig. 1) 및 purpurin (Fig. 2)의 생성량을 증가시켰다.

색소의 생합성 증가 곡선의 양상은 처리한 물질의 종류에 따라 다르게 나타났는데, Fig. 1에서 보면 배양액에 jasmonic acid, methyl jasmonate, arachidonic acid를 첨가했을 때, 3가지 경우 모두 비교적 빠른 시간내에 현저한 색소량 변화를 나타내었다. 이에 비해 yeast extract 처리시는 최대치를 나타내는 시간이 150분으로 효과가 나타날 때까지 jasmonate에 비해 많은 시간이 걸리는 것이 관찰되어서. elicitor로 세포의 jasmonate 생합성을 유도하는 것보다 jasmonate를 외부에서 직접처리했을 때의 효과가 빠르다는 것이 확인되었다. 본 실험에서 첨가한 5종의 물질중 가

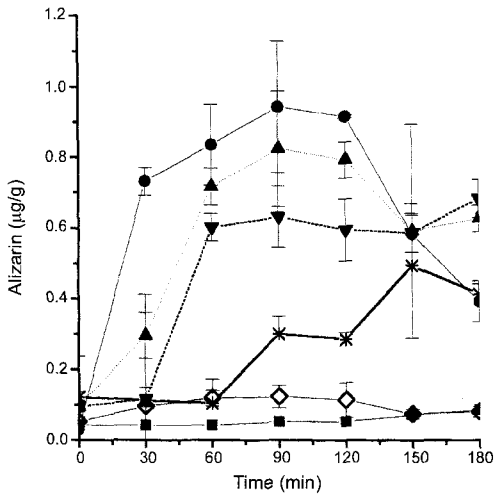

Fig. 1. Effects of jasmonate-cascade related compounds on production of alizarin (μg/g) in hairy roots of *Rubia cordifolia* var. *pratensis*. Values are mean±SE of three individual measurements within the same harvest.
—■—:control, —●—:jasmonic acid (1 mg/l), —▲—:methyl jasmonate (1 mg/l), ----▼----:arachidonic acid (1 mg/l), —◇—: linolenic acid (1 mg/l), — * —:yeast extract (600 mg/l).

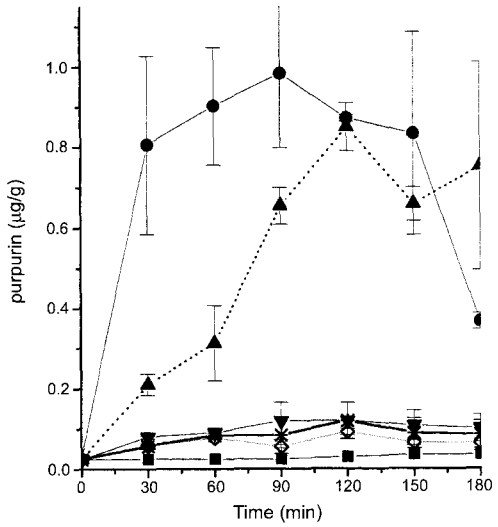

Fig. 2. Effects of jasmonate-cascade related compounds on production of alizarin (μg/g) in hairy roots of *Rubia cordifolia* var. *pratensis*. Values are mean±SE of three individual measurements within the same harvest.
—■—:control, —●—:jasmonic acid (1 mg/l), —▲—:methyl jasmonate (1 mg/l), ----▼----:arachidonic acid (1 mg/l), —◇—: linolenic acid (1 mg/l), — * —:yeast extract (600 mg/l).

장 빠르고 강한 색소 합성 증가 효과를 나타낸 것은 jasmonic acid로 배양액에 jasmonic acid를 첨가하고 30분 경과시 hairy root 내 alizarin의 함량은 control의 17.8배 이상으로 증가하였고 90분 경과시에 최대치를 기록한 후 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. Purpurin 생합성에 있어서도 역시 jasmonic acid가 가장 빠르고 강한 효과를 보여서 최대치를 나타낸 시간인 90분대에 control의 39.2배 이상의 purpurin이 hariy root내에 축적되었음이 확인되었다(Fig. 2).

또한 Fig. 3에 나타난 바와 같이 0.5-1.5 mg/l의 jasmonic acid를 배양액에 첨가하고 90분 후에 hairy root의 색소를 측정 비교했을 때, jasmonic acid의 농도가 높아짐에 따라 alizarin 과 purpurin 생성도 증가하는 경향을 나타내어 jasmonic acid의 농도가 1.5 mg/l 일 때의 alizarin과 purpurin의 량은 0.5 mg/l일 때에 비해 각각 1.3배와 1.7배 높았는데, Gundlach 등[6]도 *Eschscholtzia californica* cell에서 alkaloid 생성이 jasmonate의 농도에 비례하여 변화한다는 것을 보고한 바 있다.

Jasmonate의 이러한 특정 이차대사산물의 생합성에 대한 빠르고 일시적인 상승효과는 이미 많은 식물에서 확인된 바 있는데, quinone계 색소의 생합성과 관련하여서는, Urbanek등[7]이 *Alkana tinctoria*의 세포 배양에서 methyl jasmonate 의 처리로 alkanin등 색소의 생산이 현저히 증가됨을 보고하였고, Gundlach

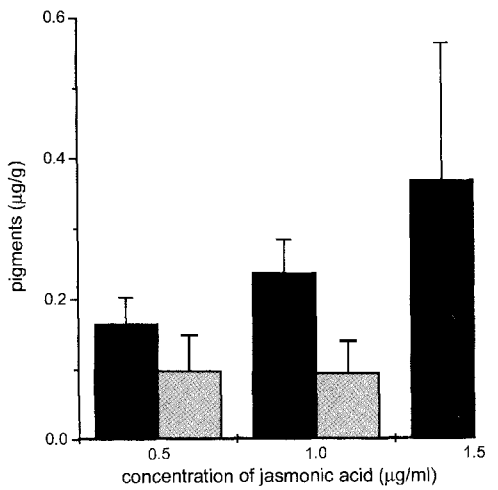

Fig. 3. Changes in accumulation of pigments in the hairy roots(ug/g, fresh weight) according to concentrations of jasmonic acid.
■ : alizarin, □: purpurin

등은 *Rubia tintorium* 배양액에 yeast extact 및 methyl jasmonate를 첨가했을 때 rubiadin량이 control에 비해 11배 이상까지 일시적으로 상승함을 관찰하였다. Methyl jasmonate의 경우는 같은 농도(1 μg/ml)의 jasmonic acid 첨가시에 비해 alizarin(Fig. 1)과 purpurin(Fig. 2) 함량의 최대치에 이르기까지 경과한 시간이 30분 정도 길었다. 같은 농도에서 jasmonic acid가 methyl jasmonate 보다 강한 효과를 나타내는 것은 이미 여러식물에서 관찰 되었으며, 이것은 대부분의 jasmonate 신호전달과정에서 methyl jasmonate가 일단 demethylation 반응을 거쳐 jasmonic acid로 전환된 후에 신호전달물질로 작용한다는 사실과 부합되는 결과이다.[8-11]

Arachidonic acid의 효과는 jasmonic acid나 methyl jasmonate의 경우에 비해 전반적으로 색소상승 비율도 낮고 최대치에 이르는 시간(120분)도 늦었으나, yeast extract 처리에 비해서는 높게 나타났는데, 이렇게 외부에서 첨가한 arachidonic acid에 의해 세포내 성분 생합성이 증가하는 현상은 이미 다른 식물에서도 확인된 바 있는데, Ciddi등[12]은 *Taxus*속의 세포배양에서 arachidonic acid(1 mg/l)를 첨가하는 방법으로 taxol의 생성량을 150% 증가시킬 수 있었으며, Shin 등[13]은 *Taxus cuspidata* 세포의 암소배양시 arachidonic acid가 baccatin III 생합성량도 증가시킴을 보고한 바 있다.

한편 일반적으로 jasmonic acid의 전구체로 알려진 linolenic acid의 처리에 의해서는 유의성있는 색소상승이 나타나지 않았는데, 이 실험만으로는 확실히 결론지을 수 없으나, 본 식물에서의 신호 전달물질 합성 cascade에 linolenic acid가 관여되지 않거나, linolenic acid의 대부분이 다른 branch reaction으로 흘러갔을 것 등을 이러한 결과에 대한 가능한 원인으로 추정할 수 있겠다.[14]

Jasmonate를 세포배양액에 첨가하기 30분전에 대표적인 단백질 생합성 저해제 중의 하나이며 특히 cytoplasmic reaction에 대한 저해효과가 큰 것으로 알려진 cycloheximide (2.8 mg/l)를 가한 시점으로부터 90분간 배양했을 때, alizarin과 purpurin의 hairy root내 색소 생합성량이 현저히 감소한 결과를 보였는데, methyl jasmonate에 비해 색소합성 촉진효과가 컸던 jasmonic acid의 경우 cycloheximide에 의한 억제도 보다 현저하게 나타나서, 본 실험에서 사용한 *Rubia cordifolia* var. *pratensis*의 색소 생합성 증가를 유도하는 신호 전달계에서 jasmonic acid가 가장 직접적이고 효과적인 물질임을 시사하였다(Table I).

사 사

본 연구는 덕성여자대학교의 1999년도 교내연구비의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. 이창복 (1985) 한국식물도감, 향문사, 서울.
2. 김태정 (1996) 한국의 자원식물, 124, 서울대학교 출판부, 서울.
3. Shin, S. W. and Kim, Y. S. (1989) Studies on the production of anthraquinone derivatives by tissue culture of *Rubia* species. *Arch. Pharm. Res.* 12: 99-102.
4. Kawasaki, Y., Goda, Y. and Yoshihira, K. (1988) Anthraquinones from *Rubia tinctorium*, *Shoyakugaku Zasshi* 42: 166-167.
5. Shin, S. W. and Kim, Y. S. (1996) Production of anthraquinone derivatives by hairy roots of *Rubia cordifolia* var. *pratensis*. *Kor. J. Pharmacogn.* 27: 301-308.
6. Gundlach, H., M ller, M. J., Kutchan, T. M. and Zenk, M. H. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Plant Biology 89: 2289-2293.

Table I. Effects of elicitors on accumulation of pigments in cultured cells of *Rubia cordifolia* var. *pratensis* before and after treatment of cycloheximide(2.8 mg/l)

Elicitors	Alizarin (μg/g)		Purpurin (μg/g)	
	before	after	before	after
Control	0.042 ± 0.017	0.038 ± 0.028	0.025 ± 0.034	0.021 ± 0.015
Jasmonic acid	0.942 ± 0.286	0.271 ± 0.060*	0.983 ± 0.185	0.451 ± 0.091*
Methyl jasmonate	0.823 ± 0.264	0.357 ± 0.034*	0.655 ± 0.045	0.439 ± 0.048**

Methyl jasmonate(1 mg/l) and jasmonic acid(1 mg/l) were added to Nitsch & Nitsch liqid culture medium. The cells were harvested in 90 minutes after addition of the elicitors and extracted for quantitative analysis of alizarin and purpurin. All values are means ± SE of three individual measurements within the same harvest. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (*$p<0.05$ and **$p<0.01$).

7. Urbanek, H., Bergier, K., Saniewski, M. and Patykowski, J. (1996) Effect of jasmonates and exogenous polysaccarides on production of alkanin pigments in suspension cultures of *Alkana tinctoria*. 15: 637-641.
8. Creeman, R. A. and Mullet, J. E. (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4114-4119.
9. Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T., M ller, J. M., Xia, Z.-Q. and Zenk, M. H. (1995) The octanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4099-4105.
10. M ller, J .M., Brodschelm, W., Spannel, E. and Zenk, M. H. (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the octanodecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7490-7494.
11. Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. and Hara, Y. (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in Taxus cell suspension culture. *Nat. Biotechnol.* 14: 1129-1132.
12. Ciddi, V., Srinivasan, V. and Shuler, M. L. (1995) Elicitation of Taxus sp. cell cultures for production of taxol. *Biotechnol. Lett.* 17: 1343-1346.
13. Shin, S. W., Kim, Y. S. and Lim, S. (2000) Elicitors for the regulation of baccatin III biosynthesis in plant cell culture system. *Yakhak Hoeji*, 44: 60-65.
14. Vick, B.A. and Zimmermann, D. C. (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* 74: 458-461.

(2000년 5월 17일 접수)