

## Polyamine이 시호의 모상근 배양에 미치는 영향

†표 병 식 · 김 영 준 · \*황 백  
동신대학교 식품영양학과, \*전남대학교 생물학과

### Effect of Polyamine on Hairy Root Culture of *Bupleurum falcatum* L.

Byoung-Sik Pyo<sup>†</sup>, Young-Jun Kim and Baik Hwang<sup>\*</sup>

Department of Food and Nutrition, Dongshin University, Naju 520-714, Korea  
<sup>\*</sup>Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

#### ABSTRACT

During culture the effect of polyamine on hairy root of *Bupleurum falcatum* by infection of *Agrobacterium rhizogenes* was studied. The fresh and dry weight of hairy root which cultured for 3 months in MS medium increased about 7-fold when spermine at 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M was treated. After suspension culture of *B. falcatum* in MS medium containing putrescine(10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) or spermine(10 $\mu$ M), the contents of endogenous polyamine (putrescine, spermidine, spermine) was higher than that of control. The  $\beta$ -glucan synthetase II activity by polyamine treatment was increased: especially spermidine (100 $\mu$ M) and spermine(100 $\mu$ M) stimulated it by about 180% and 220% respectively. These results suggest a possible role of polyamine as growth regulator in *B. falcatum* hairy root cultures.

#### 서 론

시호는 미나리과에 속하는 다년생 초본식물로 시호 뿌리의 약효가 입증되고 있어 최근 수요가 급증하고 있는 중요한 생약이다. 시호의 약리작용으로는 현저한 해열작용, 간장해독작용, 혈압강하작용, 항염증작용, 항알러지작용 등이 연구 보고되었고, 생화학적으로는 간단백질 생합성 촉진작용, 간 glycogen 합성촉진작용, 혈장 cholesterol, triglyceride, 인지질 등의 농도상승억제작용 등을 나타내어 결국은 강력한 항염증작용에 기인한 간장해독 개선작용을 보이는 것으로 알려져 있다(1). 이와 같은 작용을 보이는 시호의 약리성분은 olenane계 saponin인 saikosaponin a와 d에 의한 것으로 많은 연구에 의해 입증되고 있으며(2,3) saikosaponin c의 경우

에도 당을 제거한 sapogenin이 동일한 약리작용을 보이는 것으로 밝혀졌다(4).

한편, 식물조직배양에서 일반적으로 행하여지고 있는 탈분화된 캘러스 또는 세포현탁배양의 경우는 *Lithospermum erythrorhizon*에서의 shikonin 생산(5)을 제외하고는 일반적으로 미분화된 세포의 유전적, 생화학적 이질성에 기인하여 2차대사산물을 기대하는 수준만큼 얻는데 많은 어려움을 겪고 있다(6). 하지만 80년대 후반부터 시작된 root-inducing plasmid (Ri-plasmid)가 내재된 *Agrobacterium rhizogenes*라는 토양미생물을 감염시켜 유도한 형질 전환된 모상근(hairy root) 배양을 통하여 여러 가지 유용한 2차대사물질의 획득에 있어 주목할 만한 결과를 보여주고 있다(7, 8, 9). 이들 모상근은 계층 내에 삽입되어 있는 Ri-plasmid의 일부 유전자(T-DNA)에 존재하는 식물 성장호르몬의 생합성에 관

† Corresponding Author

여하는 일부 유전자가 발현됨으로써 외재 호르몬의 공급 없이도 빠른 생장을 보이고 오랜 배양기간에 있어서도 안정하며(10, 11), 특히 뿌리나 근경에서 합성되는 일부 2차대사산물의 경우에 있어서는 원식물의 뿌리에 비교되는 질적 양적인 수준의 합성을 보여주고 있다.

식물의 성장과 분화에 관여하는 생장물질 중의 하나인 polyamine은 모든 생물체에 광범위하게 분포하며(12), 세포의 증식과 분화 및 기능수행에 필수적이다(13, 14). 또한 이를 뒷받침하는 많은 연구결과에 의하면 polyamine이 세포소기관뿐만 아니라 기관분화도 촉진한다(15, 16). 그리고 polyamine은 생리학적 pH에서 다가양이온으로 작용하여 음전하를 띠는 핵산과 강하게 결합함으로써 핵산을 안정화시켜 주고(17, 18), 핵산의 합성을 촉진하며(19), 단백질 분해효소와 핵산 분해효소의 활성억제 및 노화억제 등의 다양한 기능을 한다(20, 21, 22). 한편 polyamine이 대두 배의 발생과 성장시 체세포 발생에 관련되어 있고(23), 세포분열 과정과 생장과정 동안 대사과정에 작용하는 효소에 영향을 미치며(24), 식물체 종자들의 발아시 polyamine이 식물체 농도에 따라 전반적으로 성장과 분화에 영향을 미침과 동시에 단백질과 지질의 합성 및 DNA, RNA의 함량을 증가시킨다(25, 26).

따라서 생약제로서 각광을 받고 있는 시호뿌리로부터 모상근을 유도하여 식물의 생장조절물질인 polyamine 처리에 의한 대량증식 조건을 설정하고자 하며, 식물 생장에 있어서 중요한 지표인 모상근의 세포벽 형성에 관련된 효소의 활성을 조사함으로써 인체에 유용한 2차대사산물의 대량생산에 필요한 기초자료를 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 균주

시호(*Buplerum falcatum* L.)는 국내에서의 주요 재배 품종인 시시호의 종자를 무균 발아시킨 다음 유식물체를 1~2cm의 길이로 절편화하여 본 실험의 재료로 사용한다. 사용 균주는 *A. rhizogenes* A<sub>4</sub>이며, 감자추출배지(potato 2%, sucrose 1.5%, agar 1.5%)로 27°C 암소에서 2일간 배양하여 멸균수로 약 10<sup>8</sup> bacteria/ml가 되게 희석하여 사용하였다.

### 모상근 유도 및 배양

2, 4-D 2mg/l 이 첨가된 MS 액체배지에서 균과

유식물체의 절편을 2일간 coculture한 후 멸균수로 균과 호르몬을 철저히 세척한 다음 항생제인 cefotaxime 300mg/l 이 들어 있는 MSO 고형배지에 절편을 치상하여 균의 제거와 동시에 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근은 진탕배양하여 활발히 자라는 많은 모상근을 모아서 3주마다 계대배양하여 실험재료로 사용하였다.

### Polyamine 처리에 의한 모상근 배양의 영향

Polyamine(putrescine, spermidine, spermine)을 농도별(각 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M)로 수정된 MS 배양배지(myo-inositol 제거)에 첨가하여 3개월간 현탁배양한 후 모상근 생장을 측정하였으며, 생장비 측정법으로는 각 측정구 0.2g(fresh weight)을 30ml의 배지에 접종하여 3개월간 배양(3주마다 계대배양)한 후 여과지로 물기를 충분히 제거한 다음 생중량과 -75°C 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 건중량을 측정하였다. 또한 생장의 indicator인 세포벽 합성효소( $\beta$ -glucan synthetase)의 활성을 비교 측정하였다.

### Polyamine 추출 및 정량

Polyamine을 농도별로 처리하여 현탁배양한 시호 모상근을 5g씩 취하여 5% perchloric acid 15ml로 균질화시킨 다음 4°C에서 27,000xg로 20분간 원심분리하여 그 상등액을 polyamine을 정량하는데 사용하였다. 정량방법은 상등액 200 $\mu$ l, dansyl-chloride 400 $\mu$ l, 그리고 포화된 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 $\mu$ l를 각각 혼합하여 24시간 동안 상온의 암실에서 방치한 다음 100 $\mu$ l proline을 첨가하여 30분간 방치한 후 500 $\mu$ l benzene으로 dansyl 유도체를 추출하여 이중 200 $\mu$ l를 Silica gel T. L. C. plate에 점적하였다. 전개용매 조성은 chloroform : triethylamine (25:2, V/V)이며 자외선으로 표준시료와 비교한 다음 굽어내어 다시 ethylacetate에 용출시켜 Spectrofluorophotometer(Excitation 365nm, Emission 495nm, Shimadzu RF-5000)에서 형광광도를 측정하였다(27).

### $\beta$ -glucan Synthetase II의 추출과 활성 측정

Cerenius와 Soderhael(28)의 방법을 일부 수정하여 효소의 추출과 활성 측정을 시행하였다. 시료의 추출액은 1M sucrose, 4mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1mM DTT, 25 $\mu$ M GTP 등이 포함된 0.1M Tris 완충액(pH 8.0)을 사용하였다. 마쇄된 용액을 나일론 천

Table 1. The effect of polyamine on growth of hairy root of *Bupleurum falcatum*.

Treatment	Fresh weight(g)	Dry weight(g)
Control	2.2	0.19
Putrescine, 10 $\mu$ M	9.8	0.72
100 $\mu$ M	6.3	0.50
Spermidine, 10 $\mu$ M	8.5	0.61
100 $\mu$ M	11.2	0.86
Spermine, 10 $\mu$ M	17.0	1.42
100 $\mu$ M	16.0	1.59

Hairy roots were cultured at 27°C in modified MS medium for 3 months. The initial weight of hairy root was 0.02g(f.w). Each value is the mean of three replicates.

으로 걸러서 여과액을 6,800xg에서 15분간 원심분리하고 그 상등액을 다시 40,000xg에서 45분간 원심분리해서 얻은 원침물을 Tris 완충액에 현탁하여 조효소로 사용하였다. 효소 반응은 추출한 조효소와 200 $\mu$ l의 Uridine diphospho-D-[U-<sup>14</sup>C] glucose가 포함된 Tris 완충액을 27°C에서 2시간 반응시킨 후 효소반응 증지를 위해 1ml의 trichloroacetic acid를 첨가한 다음 잘 혼합하여 이것을 Whatman GF/C glass filter로 여과한 후 반응하지 않은 기질을 세척해 내기 위해서 10% trichloroacetic acid 용액을 3ml씩 3번, 96% ethanol로 3ml씩 3번 세척하였다. 이 glass filter를 말린 후 15ml의 scintillation cocktail solution(PPO, POPOP, toluene, triton X-100)에 넣고 1시간 이상 방치한 후 Scintillation counter(Packard)로 방사능을 측정하였다.

단백질 정량

단백질은 Lowry 등(29)의 방법을 이용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

Polyamine에 의한 시호모상근의 생장에 미치는 영향

시호모상근을 변형한 MS 배지에 polyamine을 농도별로 처리하여 3개월간 현탁배양한 후 생체중량과 건조중량을 조사한 결과 polyamine을 처리하지 않은 대조구보다 처리구 모두에서 증가하였다(Table

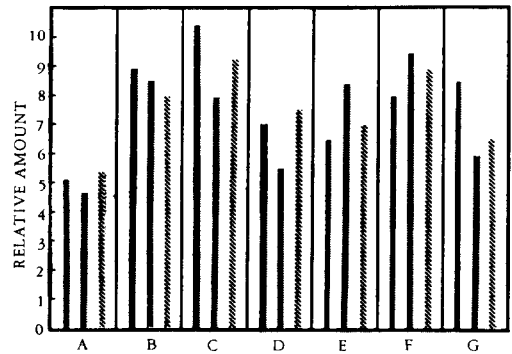


Fig. 1. The comparison of polyamine contents in hairy root of *B. falcatum* cultured in modified MS medium containing polyamine for 3months. Polyamine contents were measured using spectrofluorimeter (excitation wavelength 365nm, emission wavelength 495nm).

The relative amount was represented on the basis of polyamine contents of control.

- A:Control B:Putrescine, 10 $\mu$ M
- C:Putrescine, 100 $\mu$ M D:Spermidine, 10 $\mu$ M
- E:Spermidine, 100 $\mu$ M F:Spermine, 10 $\mu$ M
- G:Spermine, 100 $\mu$ M ■:Putrescine
- ▨:Spermidine ▩:Spermine

1). 특히 spermine(10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) 처리구에서는 생체중량과 건조중량을 대조구보다 약 7배 이상 증가시켜 시호모상근 배양에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 polyamine이 뿌리 발생에 있어서 종에 따라 특이성이 있는 것으로 알려져 있는데, 예를 들어 polyamine이 강낭콩의 뿌리 초기 발생과정을 촉진하였고(30), 옥수수 뿌리에서 세포벽의 전구물질인 탄수화물 함량을 증가시켰으며, spermine이 뿌리의 정단 부근에서 검출되었다는 보고(31)를 고려해 볼 때 *A. rhizogenes*라는 균주에 의해 유도된 모상근도 뿌리의 일종으로써 polyamine에 의해 세포분열과 성장이 활발히 일어나 (1, 2) 생체중량과 건조중량을 증가시킨 것으로 보여진다. 이는 과일이 익어가는 동안에는 식물체내 polyamine 함량이 세포분열이 활발히 일어나는 시기와 비교했을 때 매우 낮다는 사실을 뒷받침해 주고 있다(32). 특히 식물호르몬이 없는 배지에서 정상 뿌리보다 훨씬 빠른 성장 속도를 보이고 염색체 구조나 핵형이 안정하여 유용한 2차대사산물의 형성에 있어 모식물

Table 2. The effect of polyamine on  $\beta$ -glucan synthetase II activity of *Buplerum falcatum*.

Treatment	GS II activity(cpm/mg protein)	
	cpm	% control
Control	1,480	100
Putrescine, 10 $\mu$ M	1,870	126
	100 $\mu$ M	139
Spermidine, 10 $\mu$ M	2,460	166
	100 $\mu$ M	182
Spermine, 10 $\mu$ M	2,920	197
	100 $\mu$ M	223

The hairy roots were incubated at 27°C in modified MS medium for 3 days. [<sup>14</sup>C]-UDPGlucose was used as a substrate and the formation of [<sup>14</sup>C]glucan was measured.

체와 같거나 그 이상을 함유하게 되는 특징을 지닌 모상근(33, 34)의 대량배양에 polyamine이 긍정적인 역할을 하는 것으로 보아 배양배지 조성에 polyamine 첨가가 대량증식에 필요하리라는 것을 보여준 결과라 생각된다.

Polyamine이 시호모상근의 Putrescine, Spermidine, Spermine 함량에 미치는 영향

Fig. 1은 시호모상근에 polyamine(exogenous)을 농도별로 처리하여 3개월간 현탁배양한 후 모상근에 함유된 내재 polyamine의 함량을 측정된 결과이다. Putrescine 처리구(10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M)와 spermine 처리구(10 $\mu$ M)에서 대조구보다 putrescine, spermidine, spermine의 함량이 높게 나타났다. 이러한 현상은 polyamine이 생체중량과 건조중량을 증가시킨 결과와 비교해 볼 때 중량을 증가시킨 비율보다는 작은 함량의 증가를 나타냈다. 이는 빠른 속도로 생장 내지는 분열이 왕성한 조직에서는 polyamine의 함량도 빠르게 증가한다는 보고(35, 36)를 고려해 볼 때 polyamine 처리구에서 생체중량과 건조중량이 현저히 증가했던(Table 1)결과와 polyamine 함량이 높아진 본 실험은 일치하였다. 그러나 외부적으로 polyamine을 처리하였을 때 시호모상근에서 polyamine의 현저한 증가는 가져오지 못했다. 이는 세포팽창(cell expansion)이 세포내의 polyamine 농도를 떨어뜨려서 결국 세포분열 직후에는 함량이

낮아지게 되며, 낮아진 만큼의 polyamine은 아직 확실하게 밝혀져 있지 않은 화합물로 전환된다는 사실(37)로 미루어 보아 외부적으로 polyamine을 처리했음지라도 현저한 polyamine의 증가는 가져오지 않는 것으로 사료된다.

시호모상근에 있어서 Polyamine이  $\beta$ -Glucan Synthetase II(GS II)의 활성에 미치는 영향

시호모상근에 polyamine을 농도별로 처리하여 3일간 현탁배양(MS 배지)시킨후 GS II의 활성을 측정된 결과 polyamine 처리구 모두에서 대조구보다 그 활성을 증가시켰다(Table 2). 특히 spermidine(100 $\mu$ M)과 spermine(100 $\mu$ M) 처리구에서는 각각 180%, 220% 정도 효소활성을 촉진시켰다. 세포벽 구성 성분중 세포질내에서 생성되어 세포벽내에 축적되는 callose는 세포벽 발달과정의 특징이며 원형질막에 존재하는 GS II에 의해 합성되어지고 UDPGlucose를 기질로 하여  $\beta$ -1,3-glucan을 세포벽내에 축적한다(27). 이러한 callose는 세포판 및 화분관 형성과 같은 식물의 발생단계에 필수적이므로(38, 39) polyamine에 의한 세포분열과 생장이 촉진된 모상근(Table 1)에서 세포생장의 지표(13, 14)인 세포벽의 합성효소(GS II) 활성이 증가된 것으로 여겨진다. 결국 polyamine은 생장조절물질로서 시호모상근 생장에 중요한 인자로 작용할 수 있는 가능성을 제시해 주었다.

## 요 약

Polyamine이 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 유도된 시호(*Buplerum falcatum* L.)의 모상근 배양에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. Polyamine을 처리하여 현탁배양했을 때 대조구에 비해 생체중량과 건조중량을 모두 증가시켰으며, 특히 spermine(10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) 처리구에서는 약 7배 이상 증가시켜 시호모상근 배양에 가장 효과적이었다. 또한 polyamine을 처리하여 시호모상근을 현탁배양한 후 내재 polyamine을 측정된 결과 putrescine(10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) 처리구와 spermine(10 $\mu$ M) 처리구에서 대조구보다 putrescine, spermidine, spermine의 함량이 상대적으로 높게 나타났다. Polyamine에 의한  $\beta$ -glucan synthetase II의 활성은 대조구에 비해 증가시켰으며, 특히 spermidine(100 $\mu$ M)과 spermine(100 $\mu$ M) 처리구에서는 각각 180%, 220% 정도의 효소활성을 촉진시켰다. 이러한 결과는 polyamine

이 생장조절물질로서 시호모상근 배양에 중요한 인자로 작용할 수 있음을 시사해 주었다.

## 감 사

본 연구는 1994년도 동신대학교 교내 학술연구조성비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. M. Shibata and K. Tagaki (1969), *Yakugaku zasshi*, **89**, 1367.
2. M. Kimata, R. Kasai and O. Tanaka (1982), *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4373.
3. A. Shimaoka, S. Seo and H. Minato (1975), *J. C. S. Perkin I*, **5**, 2043.
4. M. Yamamoto, A. Kumagai and Y. Yamamura (1975), *Arzein. Forsch.*, **25**, 1021.
5. Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto (1981), *Plant Cell Rep.*, **1**, 61.
6. M. Taya, A. Yoyama, R. Nomura, O. Kondo, C. Matsui and T. Kobayashi (1989), *J. Ferment Bioeng.*, **67**, 31.
7. E. Knopp, A. Strauss and W. Wehrli (1988), *Plant Cell Rep.*, **7**, 590.
8. C. Matsui, Y. Mano, S. Nabeshima and H. Ohkawa (1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2715.
9. S. Sakamoto, K. Sato, S. Iwakami, Y. Goda, T. Maitani, M. Takeda, K. Yoshihira, T. Saito and H. Kamada (1992), *Plant Tissue Culture Lett.*, **9**, 43.
10. E. L. H. Aird, J. D. Hamill and M. J. C. Rhodes (1988), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **15**, 47.
11. P. Christen, M. F. Roberts, J. D. Phillipson and W. C. Evans (1989), *Plant Cell Rep.*, **8**, 75.
12. A. Toninello, L. D. Via, D. Silipraanodi and K. D. Garlid (1992), *J. Biol. Chem.*, **267**(26), 18393.
13. C. W. Tabor and H. Tabor (1984), *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 749.
14. H. Maki, S. Ando, H. Kodama and A. Komamine (1991), *Plant Physiol.*, **96**, 1008.
15. S. H. Cheng and C. H. Kao (1983), *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1463.
16. B. I. Naik and S. K. Srivastava (1978), *Phytochemistry*, **17**, 1885.
17. D. T. Hung, L. J. Marton, D. F. Deen and R. H. Shafer (1982), *Science*, **221**, 368.
18. H. S. Basu and L. J. Marton (1987), *Biochem. J.*, **224**, 243.
19. T. A. Smith (1985), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 117.
20. A. W. Galston, A. Altman and T. Kaur-Sawney (1978), *Plant Sci. Lett.*, **11**, 69.
21. Z. D. Zepur and P. U. Narcin (1994), *Phytochemistry*, **35**(4), 869.
22. Z. Singh and L. Singh (1995), *J. Horticult. Sci.*, **70**(2), 271.
23. P. P. C. Lin, D. B. Egli, G. M. Li and L. Meckel (1984), *Plant Physiol.*, **76**, 366.
24. S. Valeria, P. Torrigiani and N. Bagni (1990), *Physiologia Plantarum*, **80**, 515.
25. D. Burtin, J. M. Tanguy, M. Paynot, M. Caree and N. Rossin (1990), *Plant Physiol.*, **93**, 1398.
26. R. Rastogi and P. J. Davies (1991), *Plant Physiol.*, **95**, 41.
27. R. Goren, N. Palavan, H. E. Flores and A. W. Galston (1982), *Plant Cell Physiol.*, **23**(1), 19.
28. L. Cerenius and K. Soderhael (1984), *Physiologia Plantarum*, **60**, 247.
29. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
30. B. C. Jarvis, S. Yasmin and M. T. Coleman (1985), *Physiologia Plantarum*, **64**, 53.
31. F. M. Dumortier, H. E. Flores, N. S. Shekhawat and A. W. Galston (1983), *Plant Physiol.*, **72**, 915.
32. J. L. Casas, M. Acosta, J. A. Del Rio and F. Sabater (1990), *Plant Growth Regul.*, **9**, 89.
33. T. Furuya, T. Yoshikawa, Y. Orihara and H. Oda (1983), *Planta Med.*, **48**, 83.
34. H. Kamada, N. Okamura, M. Satake, H. Harada and K. Shimomura (1986), *Plant Cell Rep.*, **5**, 239.
35. C. W. Tabor and H. Tabor (1984), *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749.

36. A. E. Pegg (1986), *Biochem. J.*, **234**, 249.
37. E. C. Marcos, E. Cohen, S. Arad, N. Bagni and Y. Mizrahi (1993), *Physiologia Plantarum*, **87**, 14.
38. D. P. Delmer (1987), *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **38**, 259.
39. C. Carpita and D. P. Delmer (1981), *J. Biochem.*, **256**(1), 308.