

## Elicitor 에 의한 baccatin III 의 세포내 생합성 조절연구

신승원<sup>#</sup> · 김유선 · 임 숙

덕성여자대학교 약학대학

(Received November 11, 1999)

### Elicitors for the Regulation of baccatin III Biosynthesis in Plant Cell Culture System

Seung-Won Shin<sup>#</sup>, You Sun Kim and Sook Lim

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

**Abstract** — The yeast extract, coconut water, safflower seed oil, arachidonic acid, linolenic acid, jasmonic acid and methyl jasmonate were added to Gamborg's B<sub>5</sub> medium. The changes on productivity of baccatin III were estimated every 30 minutes and the results were compared using the selected high yielding cell culture system of *Taxus cuspidata*. In most cases, the peaks of baccatin III productivity occurred at 90~120 min after addition of elicitors. Among the compound elicitors, safflower seed oil showed the highest productivity of baccatin III. Also arachidonic acid and linolenic acid increased the baccatin III production.

**Keywords** □ Baccatin III, safflower oil, arachidonic acid, linolenic acid, jasmonate, elicitor, *Taxus cuspidata*

현재 고가 향암제 taxol의 생산은 주로 주목의 수피로부터 추출하는 방법이 이용되고 있고, 그외 잎에서의 추출법,<sup>1)</sup> 새로운 추출 자원 식물의 개발,<sup>2)</sup> 주목 세포배양법, taxol을 생산하는 특정 미생물 배양에 의한 생산법 등<sup>3,4)</sup>이 연구되고 있으나, 각각 식물자원이나 성장속도, 모식물에의 의존성 문제등의 제한점이 있어서 이들 방법에 의한 대량생산이 보편화되지 못하고 있는 실정이므로, 현재로는 일단계로 주목의 배양세포에서 taxol에 비해 수율이 현저히 높은 baccatin III 및 10-deacetyl baccatin III를 세포배양법으로 생산한 후에, 다음 단계로 화학 합성반응에 의해 taxol의 구조를 완성하는 방법이 가장 유망한 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup>

주목의 세포배양법에 의한 baccatin III 등의 생산에 있어서, 신호를 전달하여 방어물질의 생산에 관여하는 유전자를 합성하도록 유도하는, 식물에 가장 보편적인 신호전달물질인 jasmonate등으로 baccatin III의 생합

성을 현저히 증가시킬 수 있다는 사실이 Ciddi 등에 의해 확인되었으며,<sup>6,8)</sup> 전보에 저자 등은 한국산 주목의 현탁배양세포내 baccatin III 생산성을 높이는 방법으로 mevalonic acid, leucine, phenylalanine, benzoic acid 등의 생합성 precursor를 가했을 때의 결과를 비교하였고, yeast extract, coconut water, maleic acid hydrazide, N-phosphomethyl glycine, succinic acid 2,2-dimethyl hydrazide 등의 elicitor 후보물질을 처리하고 3~4 주간 배양하여 control에 비해 약 5~10 배의 수율을 얻었음을 보고한 바 있다.<sup>10)</sup>

본 논문에서는 한국산 주목 *Taxus cuspidata*의 배양세포내 baccatin III의 생합성을 촉진시킬 수 있는 새로운 elicitor를 개발하고, 또한 elicitor 에 의한 taxane 유도체의 세포내 생합성 조절방법을 확립하기 위하여, jasmonate의 생합성 cascade에 관련되는 물질인 jasmonic acid 및 methyl jasmonate, arachidonic acid, linolenic acid 처리 직후 단시간내의 baccatin III의 생합성의 변화를 고찰하고, 천연 복합물질상태인 elicitor로, yeast extract 및 관련지방산이 다량 함유

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-901-8384 (팩스) 02-901-8386

된 복합물질인 safflower oil과 일반적으로 elicitation 작용이 강한 것으로 알려진 coconut milk<sup>11)</sup>의 처리후의 생산량 및 pH의 변화를 비교하여 본 결과로, 이 두가지 천연복합물질의 baccatin III에 대한 elicitation 작용이 있음을 확인하였기에 이를 보고한다.

### 재료 및 방법

**세포배양** - 본 연구실에서 개발한 baccatin III 생산성이 높은 *Taxus cuspidata*의 cell line TCMBdk98을 전보에 사용한 것과 같은 조성의 Gamborg B<sub>5</sub> 배지 100 ml 씩에 계대배양하고, yeast extract 200 mg/l, safflower seed oil 1 mg/l, coconut water 100 mg/l, linolenic acid 1 mg/l, arachidonic acid 1 mg/l, methyl jasmonate 1 mg/l, jasmonic acid 1 mg/l의 농도가 되도록 각 물질당 3개씩의 flask에 elicitor를 첨가하고 25°C, 암조건에서 110±10 rpm으로 진탕 배양 후, 매 30분 간격으로 flask를 꺼내어 감압여과로 세포를 수거하고, 중량을 측정후 동결건조하여 추출하였다. 단백질 합성저해물질인 cycloheximide(2.8 mg/l)의 영향을 실험할 경우는 멸균된 cycloheximide용액을 무균실에서 배양 flask 안에 주입하고 30분 후에 elicitor를 가한 다음, 위와 같은 방법으로 배양하였다. 또한 Elicitor를 첨가하기 6분 전부터 첨가 후 30분까지 2분 간격으로 pH 변화를 측정하고, 1-aminobenzotriazole(ABT) 10 µM, staurosporine 1 µM의 존재하에 elicitor를 처리했을 때의 결과와 비교하였다.

**Baccatin III의 정량** - 전보에 보고한 방법에 따라 각 flask당 100 ml의 액체배지에서 배양하여 여과한 주목세포를 분쇄하고 methanol 30 ml를 가하여 3분간 sonication 시킨 후 여과하고, 증발, 농축한 후, 잔사를 증류수에 녹여 dichloromethane으로 2회 추출하여 용매를 제거하고, HPLC용 methanol 5 ml에 녹여 microfilter로 2회 여과하고 Sep-Pak(silica, Waters)으로 전처리하여 Waters의 Solvent Delivery System 501에서 µ-bondapak CN(3.9×150 mm) column을 사용하고, MeOH : acetonitrile : H<sub>2</sub>O(20 : 31 : 49)로 전개하여 용출되는 baccatin III를 227 nm에서 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### Jasmonic acid 생합성 cascade 관련물질의 영향

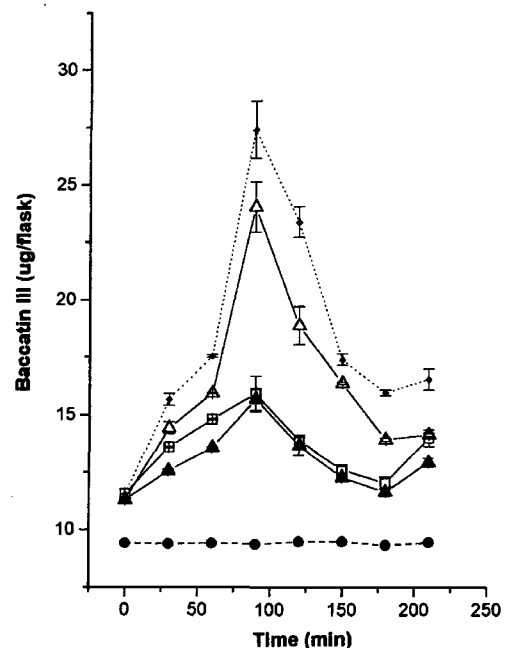


Fig. 1 - Effects of jasmonate-cascade related compounds on production of baccatin III in cultured cells of *Taxus cuspidata*. Values are mean±SE of three individual measurements within the same harvest. --●--; control, --▲--; arachidonic acid (1 mg/l), --□--; linolenic acid (1 mg/l), --△--; jasmonic acid (1 mg/l), --◆--; methyl jasmonate (1 mg/l).

- 본 실험에서의 결과에서는 배지에 1 mg/l의 arachidonic acid를 첨가하고, 90분 후에 측정했을 때 주목 배양 세포내 baccatin III의 생성량은 각각 15.66 µg/flask 로 control의 약 1.66배에 해당하는 증가를 나타내었다(Fig. 1). 이것은 Srinivasan 등<sup>12)</sup>이 *T. chinensis*의 세포배양에서 taxol의 생합성 후반의 과정이 plastid 에서 이루어지는 반면 baccatin III의 생합성은 전반에 과정이 cytoplasmic한 것으로 결론짓고, arachidonic acid(1 mg/l)를 첨가 했을 때 taxol 생합성은 현저히 증가했으나 baccatin III의 생합성에는 별 영향을 주지 않았다고 보고한 것과는 상반된 결과인데, 이것은 기원식물 종의 차이 문제보다는 광선 조건의 차이에 기인하는 것으로 추정된다. Plastid성 반응은 일반적으로 빛에 예민하게 감응하는데 빛이 전혀 없는 본 실험의 조건에서 taxol로의 branch reaction이 억제되는 현상에 의한 feed-back의 결과인 것으로 생각된다. 한편 linolenic acid를 첨가한 경우 baccatin III의 생성량은 arachidonic acid를 첨가한 경우와 비슷

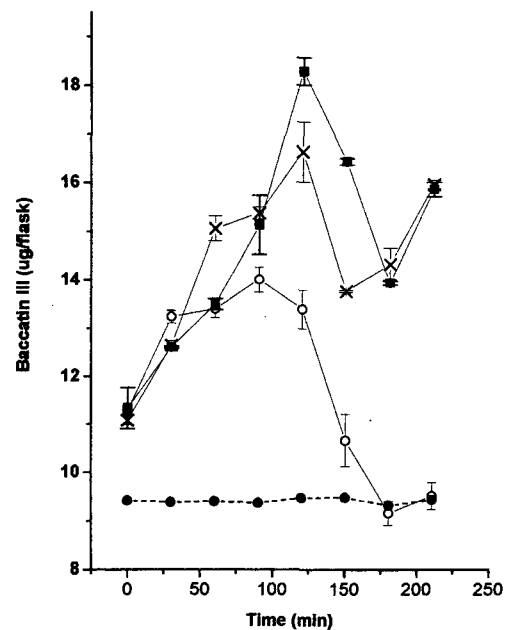
**Table I** – Effects of cycloheximide on elicitor-induced accumulation of baccatin III in cultured cells of *T. cuspidata*

	Baccatin III ( $\mu\text{g}/\text{flask}$ )			
	Elicitors		Cycloheximide + Elicitor	
	90 min	120 min	90 min	120 min
Control	9.40 $\pm$ 0.01	9.43 $\pm$ 0.03	0.70 $\pm$ 0.34	1.84 $\pm$ 0.55
Yeast Extract	14.01 $\pm$ 0.26*	13.39 $\pm$ 0.40	0.32 $\pm$ 0.21	0.37 $\pm$ 0.02
Coconut water	15.37 $\pm$ 0.12**	6.63 $\pm$ 0.61*	4.50 $\pm$ 4.40	2.83 $\pm$ 1.06
Safflower oil	15.13 $\pm$ 0.60*	18.29 $\pm$ 0.27**	6.69 $\pm$ 0.54	1.12 $\pm$ 0.97
Arachidonic acid	15.66 $\pm$ 0.48	13.66 $\pm$ 0.43	15.16 $\pm$ 0.15**	4.62 $\pm$ 0.05
Linolenic acid	15.89 $\pm$ 0.75	13.87 $\pm$ 0.13**	14.45 $\pm$ 0.41**	4.82 $\pm$ 0.10
Jasmonic acid	27.35 $\pm$ 1.24*	23.31 $\pm$ 0.66*	4.09 $\pm$ 1.15*	1.24 $\pm$ 0.45
Methyl jasmonate	23.98 $\pm$ 1.10*	18.84 $\pm$ 0.81	1.39 $\pm$ 1.31	1.44 $\pm$ 0.55

Yeast extract (200 mg/l), safflower seed oil (1 ml/l), coconut water (100 ml/l), linolenic acid(1 mg/l), arachidonic acid (1 mg/l), methyl jasmonate (1 mg/l) and jasmonic acid (1 mg/l) were added to Gamborg's B<sub>5</sub> culture medium. The cells were harvested in 90 and 120 minutes after addition of the elicitors and extracted for quantitative analysis of baccatin III. All values are means  $\pm$  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).

한 양상을 보여 본 실험조건에서 첨가한 linolenic acid는 아주 신속히 arachidonic acid로 전환되며 이 반응 이외의 branch로 흘러 가는 양이 아주 적음을 시사하였다. Methyl jasmonate와 jasmonic acid를 1 mg/l 씩 처리 시에는 90분 후에 측정된 baccatin III 가 각각 3회 측정시의 평균치가 23.98  $\mu\text{g}/\text{flask}$ , 27.35  $\mu\text{g}/\text{flask}$ 로 이 두 물질이 유사한 효과를 나타냈 으며(Table I), 이것은 control의 2.55배, 2.47배로 arachidonic acid나 linolenic acid의 경우에 비해 현저 히 높은 결과로 arachidonic acid로 부터 jasmonic acid에 이르는 사이에는 많은 branch reaction이 존재 하기 때문인 것으로 생각된다. Methyl jasmonate와 jasmonic acid의 생합성 cascade에서 전단계 물질에 해당되는 arachidonic acid나 linolenic acid에 의한 효과의 peak가 모두 90분 경과 시 나타난 것은 이 cascade 반응속도가 상당히 빨라서 30분 간격의 측정 에서 peak time 의 차이가 구별될 수 없었던 것으로 판단된다.

**복합성분 elicitor에 의한 baccatin III 생합성의 시간별 변화** – 천연 복합성분 상태의 elicitor를 주목의 액체배양계에 첨가 했을 때 얼마나 빠른 시간 내에 baccatin III의 생합성에 변화를 가져오는 가를 측정하기 위하여, 배양세포에 대해 elicitation 작용이 있는 것으로 전부터 알려져 있는 yeast extract, coconut water 및 많은 식물에서 신호전달물질로 작용하는 jasmonic acid cascade에 관련된 불포화 지방산을 다 량 함유하는 safflower seed oil를 가하여, 매 30분



**Fig. 2** – Effects of elicitors with complex compositions on production of baccatin III. Values are mean+SE of three individual measurements within the same harvest. --●--; control, --○--; yeast extract (200 mg/l), --×--; coconut water (100 ml/l), --■--; safflower oil (1 ml/l).

격으로 210분 동안 배양 세포를 추출하여 baccatin III의 생성을 측정된 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 이 실험에 사용한 3종의 elicitor가 모두 현저히 baccatin III 생성을 증가 시켰는데, 특히 safflower seed oil(1 ml/l)을 첨가하고 배양한 세포내 baccatin

III의 생성량은 120분 경과시 control의 1.94배에 해당하는 18.3  $\mu\text{g}/\text{flask}$ 로 최대를 나타내었다. coconut water(100  $\text{m}/\text{l}$ )를 배지에 첨가한 세포의 경우 baccatin III의 최대치는 120분 경과 후에 측정했을 때 16.55  $\mu\text{g}/\text{flask}$  였고, yeast extract(500  $\text{mg}/\text{l}$ )는 90분 경과시 14.01  $\mu\text{g}/\text{flask}$ 로 1.49배의 증가를 보였다. Elicitor 첨가 직전의 flask 당 세포의 평균중량은 1.183  $\text{g}$ 으로 210분의 배양기간중에는 거의 변함이 없었다. 본 실험에 사용한 3종의 복합성분 elicitor가 대부분 처리 후 90~120분에서 최대효과를 나타냈는데, 이것은 Fig. 1에 표시된 arachidonic acid, linolenic acid, methyl jasmonate, jasmonic acid 첨가시 모든 경우에 baccatin III의 생성량의 최대치가 90분 경과시에 나타난 것과 비교했을 때 전반적으로 elicitor 작용 발현에 필요한 시간이 약 30분정 정도 더 필요하다는 것을 의미하며, 이것은 이들 복합 elicitor의 조성물질이 elicitor-신호전달물질의 연결체계에서 linolenic acid보다 앞단계에 위치한다는 것을 확인시키는 결과이기도 하다. 또한 실험에 사용한 elicitor 전반에 걸쳐 90~120분까지는 baccatin III 생성량의 상승 곡선을 그리다가 이후 급격히 감소하고 다시 210분에서 약간 증가하는 경향을 보였는데, 예를 들어 coconut water를 첨가한 경우, 120분 경과 후에 측정 했을 때 16.55  $\mu\text{g}/\text{flask}$ (13.94  $\mu\text{g}/\text{g}$ 에 상당)였는데, Shin 등<sup>10</sup>이 같은 조건에서 3주간 배양했을 때 baccatin III의 함량이 112.2  $\mu\text{g}/\text{g}$ 에 이르는 것과 비교했을 때 210분 이후에도 계속 Fig. 1의 변화양상을 기본으로 하고 같은 유형으로 점차적으로 상승하는 함량곡선을 그리면서 baccatin III의 함량이 계속 증가하는 것으로 보여진다.

이상을 종합해 볼 때 yeast extract나 coconut water 및 safflower seed oil은 elicitor로 작용하는 조성성분이나 기전이 명확하지 않다는 단점이 있고 baccatin III의 생산성 증가에 있어서 jasmonic acid나 methyl jasmonate 첨가 경우에 비해 상대적으로 약간 저조하다고 볼 수 있으나, 반면 시료의 단가가 현저히 낮고 물과 잘 혼합 되어 특별한 유화제를 첨가할 필요가 없으므로 유화제 첨가 시 일반적으로 나타나는 세포성장저해의 우려를 배제할 수 있으므로 실제의 상업적인 측면에서 유용한 elicitor가 될 수 있을 것으로 판단된다.

**Cycloheximide 처리에 의한 elicitation의 저해** - 주목의 배양세포에서 cycloheximide는 baccatin III의

생합성을 저해한다. Elicitor 존재 하에서도 cycloheximide의 저해작용이 유지되는가를 알아보기 위하여, elicitor를 세포배양액에 첨가하기 30분전에 대표적인 단백질 생합성 저해제 중의 하나이며 특히 cytoplasmic reaction에 대한 저해효과가 큰 것으로 알려진 cycloheximide(2.8  $\text{mg}/\text{l}$ )를 가했을 때, 실험에 사용한 7종의 elicitor의 작용이 저해 받아서 baccatin III의 세포내 생합성량이 현저히 감소한 결과로 나타났다. 시간별 변화의 측면에서 볼 때 methyl jasmonate 와 jasmonic acid의 경우 Table I에서 볼 수 있듯이 baccatin III 생합성 촉진 효과도 다른 관련물질에 비해 빨리 발현되었지만 억제 효과 역시 상대적으로 빨리 나타나서 90분 경과 후(cycloheximide 첨가후 120분 후에 이미 현저한 감소가 관찰 되었고, 120분에서의 측정치와 큰차이가 없는 것으로 미루어 cycloheximide가 이 신호전달체계의 후반 반응에 관련되는 단백질 합성을 주로 억제한다는 것을 추정할 수 있었다. 반면 coconut water, safflower seed oil, arachidonic acid 및 linolenic acid의 경우는 120분 경과 후 baccatin III 함량의 최소치를 나타내었다.

**Elicitor 첨가 후의 pH 변화** - Fig. 3A에 나타난 바와 같이 *Taxus* 세포배양액의 pH 변화는 elicitor 종류에 따라 다르게 나타났는데, methyl jasmonate, jasmonic acid, arachidonic acid, linolenic acid(각 1  $\text{mg}/\text{L}$ ) 첨가후의 pH 증가 양상이 유사하였고, yeast extract와 coconut water의 경우는 비교적 완만한 상승 곡선을 나타내어 앞의 baccatin III 생합성에 대한 촉진 효과가 비교적 낮았던 반면 elicitor와 처리와 동시에 protein kinase inhibitor인 staurosporine을 처리 했을 경우(Fig. 3B)에 Fig. 3A에서와 같은 급격한 pH의 상승이 없어진 것은 staurosporine에 의해 신호전달 cascade가 blocking 되었기 때문인 것으로 판단된다. 일반적으로 elicitor에 의한 pH 상승은 elicitation 직후 plasma membrane의  $\text{H}^+$ -ATPase protein component, 혹은 다른 어떤  $\text{H}^+$  channel protein의 phosphorylation, 또는 proton pump에 의해 나타나는 것으로 알려져 있으나, jasmonic acid나 methyl jasmonate처리에 의해서도 이같은 급격한 pH 상승이 일어나는 현상이 최근 *Phaseolus*를 비롯한 여러 식물에서 확인된 바 있어서 jasmonate의 down stream의 어떤 단계에서 up stream에서와 유사한 현상이 일어나는 것으로 생각되고 있다.<sup>13</sup> 한편 cytochrome P-450의 "suicide inhibitor"

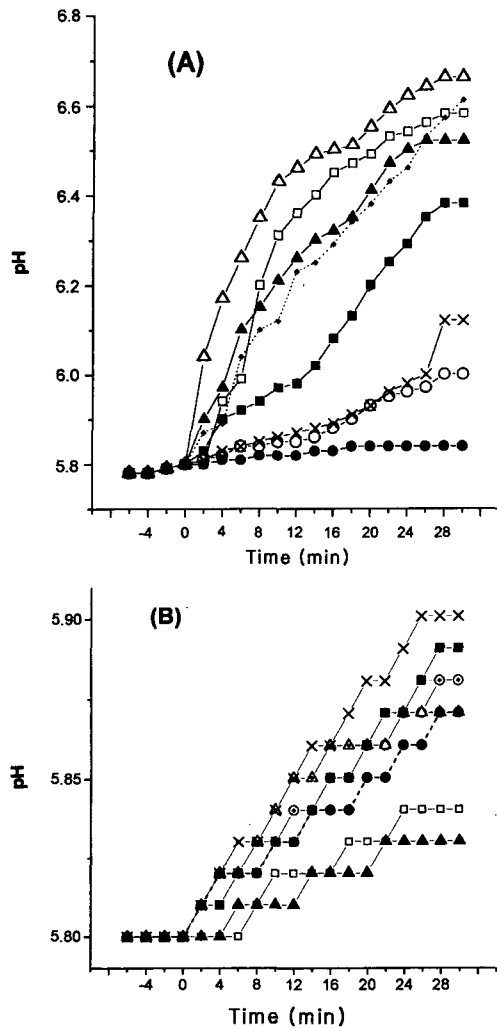


Fig. 3 - Changes in pH of extracellular solution after treatment with elicitors. (A): elicitors only, (B): elicitors and staurosporine --●--; control, --○--; yeast extract, --×--; coconut water, --■--; safflower oil, --▲--; arachidonic acid, --□--; linolenic acid, --△--; jasmonic acid, --◆--; methyl jasmonate.

로 알려진 1-aminobenzotriazole (ABT)를 처리했을 경우에 본 실험에서 앞서 사용한 모든 elicitor에 대해 pH상승을 나타내지 않는 결과가 나타나서, ABT가 jasmonate의 upstream과 down stream의 양쪽을 모두 blocking한 것으로 추정되었다.

### 감사의 말씀

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비

(자유공모과제)에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다. 또한 이 연구에 전념할 수 있도록 연구년을 주신 덕성여자대학교에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Ellis, D. D., Zeldin, E. L., Brodhagen, M. and Russim, W. A.: Taxol production in nodule cultures of *Taxus*. *J. Natl. Prod.* **59**, 246 (1996).
- 2) Jha, S., Sanyal, D., Ghosh, B. and Jha, T. B.: Improved taxol yield in cell suspension culture of *Taxus wallichiana* (Himalayan yew). *Planta Med.* **64**, 270 (1998).
- 3) Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S. and Hess, W. M.: Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology* **142**, 435 (1996).
- 4) Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P. and Bognami, G.: The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Natl. Prod.* **58**, 1315 (1995).
- 5) Zhiri, A., Jaziri, M., Guo, Y., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M., Homes, H., Yoshimatsu, K. and Shimomura, K.: Tissue cultures of *Taxus baccata* as a source of 10-deacetylbaaccatin III, a precursor for the hemisynthesis of taxol. *Biolog. Chem.* **376**, 583 (1995).
- 6) Mirhalili, N. and Linden, J. C.: Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension culture of *Taxus cuspidata*: Ethylene interaction and induction models. *Biotechnol. Prog.* **12**, 110 (1996).
- 7) Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. and Hara, Y.: Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension culture. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1129 (1996).
- 8) Ciddi, V., Srinivasan, V. and Shuler, M. L.: Elicitation of *Taxus* sp. cell cultures for production of taxol. *Biotechnol. Lett.* **17**, 1343 (1995).
- 9) Shin, S. W. and Kim, Y. S.: Production of taxane derivatives by cell culture of Korean *Taxus* species (I). *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 262 (1996).
- 10) Shin, S. W., Lee L. and Lim. S.: Production of baccatin III by plant cell culture. *Duksung Bull. Pharm. Sci.* **8**, 7 (1997).

- 11) Westgate, P., Emery, A., Hasegawa, M. and Heinstejn, P. : Growth of semicontinuous cultures of *Cephalotaxus harringtonia* with and without coconut water. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.* **23** (3pt 2), 7A (1987).
- 12) Srinivasan, V., Ciddi, V., Bring, V. and Shuler, M. L. : Metabolic inhibitors, elicitors, and precursors as tools for probing yield limitation in taxane production by *Taxus chinensis* cell culture. *Biotechnol. Prog.* **12**, 457 (1996).
- 13) Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T., Mueller, J. M., Xia, Z.-Q. and Zenk, M. H. : The octanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4099 (1995).