

미생물 유래 Dykellic Acid가 담배 녹색배양세포의 성장 및 Superoxide Dismutase 활성에 미치는 영향

곽상수* · 권혜경 · 권석운 · 이행순 · 이호재¹ · 고영희¹
생명공학연구소 식물세포공학연구실, ¹면역제어물질연구실

Effects of Dykellic Acid Derived from Microorganism on the Cell Growth and Superoxide Dismutase Activity in Tobacco Photomixotrophic Cultured Cells

KWAK, Sang-Soo* · KWON, Hye-Kyoung · KWON, Suk-Yoon · LEE, Haeng-Soon · LEE, Ho-Jae¹ · KO, Young-Hee¹
Plant Cell Biotechnology Laboratory, ¹Immune Modulator Research Laboratory, Korea
Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea

ABSTRACT To evaluate the biological effects of dykellic acid, a novel apoptosis inhibitor, isolated from microorganism on the plant cells, the cell growth, protein contents, and superoxide dismutase (SOD) activity were investigated in suspension cultures of tobacco photomixotrophic cultured (PM) cells on 12 days after different concentration of chemical treatment. The cells were cultured in MS medium containing 0.7 mg/L 2,4-D, 0.3 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose and 200 mM NaCl at 25°C in the light (100 rpm). Dykellic acid strongly inhibited the cell growth by evaluating the cell fresh wt and the ion conductivity in the medium (IC₅₀, about 20 µM). The results as inhibition of cell growth and cell wall damage were same. The compound significantly increased the protein contents and the SOD specific activity in proportion with the dosage. The results suggested that dykellic acid may have biological activity in plant cells and tobacco PM cells may be suitable biomaterials for *in vitro* evaluation of the biological activity of natural products.

Key words: Apoptosis inhibitor, biological activity, ion conductivity, tobacco green cells

서 론

미생물은 항생물질을 비롯하여 많은 종류의 유익한 생리활성 물질을 생산한다. 미생물을 포함한 천연물에서 유래한 생리활성 물질은 다량으로 얻어지는 경우도 있지만, 대부분의 경우 소량으로 얻어지는 경우가 많기 때문에 적은 양의 천연물과 합성 화합물을 사용하여 각종 생리활성을 조사할 때 적은 시료로도 화합물의 효능을 1차 평가할 수 있는 시스템이 요구

된다. 특히 식물에 대한 생리활성의 평가는 주로 어린 식물체를 대상으로 대부분 이루어지고 있어, 식물체에 대한 직접적인 효과를 평가할 수 있는 장점이 있으나, 많은 양의 시료가 필요하다는 단점이 있다. 특히 제조제를 포함한 농약의 개발에는 극미량으로 약제의 효능을 평가할 수 있는 식물의 생리활성 평가법 개발이 더욱 요구된다.

한편 식물세포배양은 식물세포의 성장과 분화에 관한 기초 연구 뿐 아니라 형질전환 식물체 개발, 유용식물의 대량번식, 유용물질의 생산 등 식물생명공학분야에 중요한 핵심기술이다. 또한 식물배양세포는 저자들에 의해 *in vivo* 활성을 반영하는 *in vitro* 활성평가시스템에 적합함이 확인된 바 있다 (Sato et al. 1991; Kwon et al. 1999). 특히 제조제 등 식물생

*Corresponding author. Tel 042-860-4432

E-mail sskwak@mail.kribb.re.kr

장조절물질의 상당수는 광합성기구에 작용하는 화합물이 많은 점을 고려한다면 염록체가 분화된 녹색배양세포는 약제의 활성을 *in vitro*에서 검색하기 위한 좋은 재료가 될 수 있을 것으로 기대된다 (Dalton 1980; Nishida et al. 1980; Sato et al. 1987; Yoshida et al. 1989; Fuerst and Norman 1991). 저자들은 최근 작용기작이 알려진 수종의 제초제를 담배 현탁 배양에 처리한 후, 세포의 성장과 배지의 이온전도도 (ion conductivity)를 조사하는 방법을 이용하면 간편하면서 재현성 있는 *in vitro* 약제 검정방법이 될 수 있음을 보고한 바 있다 (Kwon et al. 1999).

Dykellic acid는 곰팡이 (*Westerdykella multispore* F50733) 배양액에서 분리한 물질로서, 동물세포에 대한 세포 사멸 (apoptosis) 억제작용이 있으며 최근에 분리된 polyketide 화합물이다 (Lee et al. 1999). Dykellic acid에는 세포 사멸 억제 외에도 지질과산화 억제, 세포분열 억제 등 다양한 활성이 밝혀지고 있으며, 식물에 대한 억제작용에 대한 평가도 요구되는 화합물이다.

본 연구에서는 담배 광혼용배양세포 (photomixotrophic cultured cells, PM세포)에 dykellic acid를 처리하여 세포생장에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 dykellic acid를 담배 PM세포에 처리하였을 때 발생하는 활성산소종 (reactive oxygen species)에 의한 산화적인 스트레스를 평가하기 위하여 superoxide dismutase (SOD) 활성변화를 조사하였다.

재료 및 방법

식물배양세포 및 화합물 처리

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. BY 4) 광혼용배양세포 (photomixotrophic cultured cells, PM 세포)는 Cha 등 (1993)에 의해 개발된 NaCl 내성세포주를 사용하였다. 배양세포 생중량 0.7 g를 0.7 mg/L 2,4-D, 0.3 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose 와 200 mM NaCl를 함유한 MS (Murashige and Skoog, 1962) 액체배지 20 mL가 담긴 100 mL flask에 접종하여 25°C 광조건(약 $15 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)에서 현탁배양하였다 (100 rpm). 세포의 계대배양은 15일 간격으로 하였다.

Dykellic acid ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$, MW = 248) (Figure 1)는 곰팡이 (*Westerdykella multispore* F50733) 배양액에서 분리한 것을 사용하였다 (Lee et al. 1999). Dykellic acid는 ethanol에 녹여 최종농도가 0, 0.1, 10, 30, 100 μM 이 되도록 계대배양시에 배지에 첨가하였다.

세포생장 및 이온 전도도 측정

계대배양 후 12일째의 세포를 수거한 후 감압여과하여 세포생중량을 측정하였다. 무처리에 대해 50%의 세포생장을 억

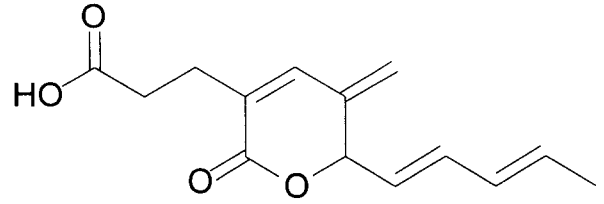


Figure 1. Chemical structure of dykellic acid isolated from the broth of *Westerdykella multispore* F50733.

제하는 농도 (IC_{50})를 구하였다. 배지의 이온 전도도 (ion conductivity)는 세포를 수거하여 얻어진 여과액을 대상으로 Orion사 전도도계 (Model 162)를 사용하여 측정하였다 (Kwon et al. 1999). 세포생장이 100% 억제된 농도에서 배지의 이온 전도도값에 대해 50%의 이온 전도도값을 나타내는 각 화합물의 농도를 IC_{50} 으로 하였다.

조효소액 추출 및 SOD 활성측정

담배 배양세포 생중량 0.5 g을 0.05 M 인산 완충액 (pH 7.0) 0.5 mL과 함께 얼음위의 막자사발에서 마쇄한 후 14,000 rpm로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질정량은 BSA를 표준단백질로 사용한 Bradford (1976)의 방법에 따라 측정하였다.

SOD 활성은 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 따라 xanthine, xanthine oxidase (XOD)와 cytochrome c를 이용하여 측정하였다. 효소측정을 위한 반응액 [10 mM xanthine 2.5 mL, 10 mM cytochrome c 0.5 mL, 0.1 mM EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액 (pH 7.8) 47 mL의 혼합액]은 매번 조제하여 사용하였다. 반응액중 cytochrome c의 농도를 일정하게 유지하기 위하여 반응액을 만든 후 sodium dithionite로 매회 보정하였다. 상기 반응액 1 mL과 효소액 (10 μL 전후)을 큐벳에 넣은 후 10^{-4} M EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액 (pH 7.8)으로 25배 희석한 XOD 10 μL 를 첨가하여 효소 반응을 시작하였다. 효소활성의 1 단위 (unit)는 25°C에서 2분간 반응하여 550 nm에서 흡광도변화를 조사하여 XOD 활성이 50% 억제된 것으로 정의하였다.

결과 및 고찰

세포생장에 미치는 영향

Dykellic acid는 담배 PM세포의 성장을 현저하게 저해하였다 (Figure 2). Dykellic acid 1 μM 에서는 세포생장에 거의 영향을 나타내지 않았으나, 10 μM 에서는 22%, 30 μM 에서는 68% 그리고 100 μM 에서는 완전히 세포를 고사시켜, 세포생

장을 50% 억제시키는 농도 (IC₅₀)는 약 21.5 μM로 계산되었다.

Dykellic acid는 화합물처리 후 빠른 시간인 1일째부터 세포가 백화 (bleaching)되어 고사되는 현상을 나타내었다 (결과 미제시). Dykellic acid의 이러한 백화현상은 저자들에 의한 다양한 작용기작을 지닌 제초제를 사용한 실험 (Kwon et al. 1999)에서 carotenoid 생합성저해제인 fluridone의 작용과 가장 유사하였다. Carotenoid는 광합성조직에서 보편적으로 존재하는 색소로서 carotenoid 함량이 감소되면 광합성계의 항산화기능이 떨어지며 이로 인해 빛에 의해 여기된 엽록소가 파괴되고 동시에 활성산소종이 발생되면서 세포막의 과산화작용이 일어나 결국 백화를 일으킨다 (Sandmann et al. 1992). 담배 PM세포를 이용한 실험에서 fluridone은 담배 녹색세포에 대해 백화현상을 일으키고 세포생장에 대한 억제활성 IC₅₀)은 100 μM로 평가되었다 (Kwon et al. 1999). Dykellic acid는 fluridone에 비해 담배 녹색배양세포에 대한 저해활성이 약 5배 정도 높으므로, 화합물을 충분히 확보한다면 식물체에 처리하여 *in vivo* 수준에서 성장저해 및 백화현상에 대한 실험을 수행할 수 있으며 많은 기초자료를 확보할 수 있을 것으로 생각된다.

0 온 전도도값에 미치는 영향

Dykellic acid를 담배 PM세포에 처리한 후 세포막의 손상을 반영하는 배지의 이온전도도 (ion conductivity) 값을 측정 한 결과는 화합물의 세포생장저해의 결과와 높은 상관성을 나타내었다 (Figure 2). Dykellic acid의 세포막저해활성 (IC₅₀)은 약 18.5 μM로 계산되었다.

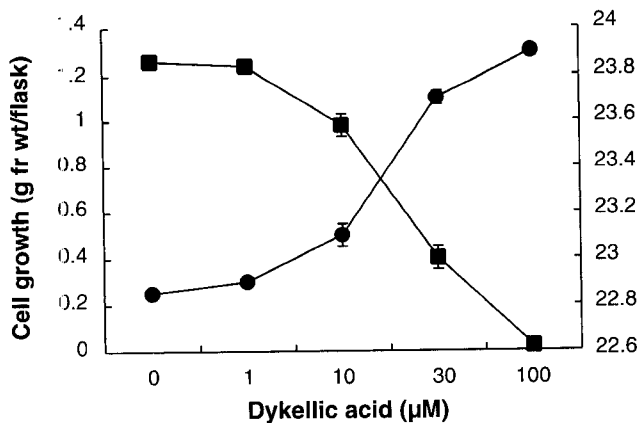


Figure 2. Effects of dykellic acid on the cell growth and ion conductivity in suspension cultures of tobacco photomixotrophic cultured cells. The chemical was added to the medium at the subculture and the effects were investigated on 12 days after treatment. - ■ - : cell growth (g fr wt/flask); - ● - : ion conductivity. Data are means ± S.E. of three replications.

본 실험의 결과에서 세포생장 저해곡선과 배지의 이온 전도도 곡선이 서로 만나는 점이 화합물의 IC₅₀값의 근사치에 해당되는 것임을 알 수 있었다 (Figure 2). 이러한 결과는 작용기작이 다른 5종의 화합물을 담배 PM세포에 처리한 실험에서도 같은 결과를 얻었다 (Kwon et al. 1999). 따라서 배지의 이온 전도도 측정은 동물세포주를 사용한 약제의 1차 효능평가처럼 간편하면서 재현성이 좋아 적은 양의 천연물 및 합성 화합물의 1차 활성을 평가하는데 유용할 것으로 시사된다 (Skehan et al. 1990). 이를 참고로 하여 저자들은 녹색배양세포와 이온전도도계를 이용하여 보다 적은 양으로 천연물의 1차 활성평가를 할 수 있는 시스템을 개발중이다.

단백질 함량과 SOD 활성에 미치는 영향

Dykellic acid 처리농도가 증가함에 비례하여 녹색배양세포의 단백질 함량은 현저히 증가하였다 (Figure 3). 단위세포 무게당 단백질 함량 (mg/g cell fresh wt)은 무처리가 2.17 mg인데 비해 10 μM과 30 μM dykellic acid 처리시에는 각각 1.5배 (3.37 mg)와 2.4배 (5.17 mg)로 크게 증가하였다. 100 μM dykellic acid 처리에서는 세포생장이 거의 억제되어 단백질 함량을 정확하게 측정할 수 없었다.

Dykellic acid 처리에 따른 SOD 비활성도 (units/mg protein)는 처리농도에 비례하여 증가하여, 무처리 3.6 unit에 비해 10 μM과 30 μM에서 각각 1.2배 (4.43 units)와 1.5배 (5.24 units)의 활성을 나타내었다 (Figure 3). Dykellic acid 처리가 담배 녹색배양세포의 SOD 활성을 증가시킨 것은 화합물처리에 의해 생체내에서 과다하게 발생하는 활성산소종을 제거하여 자신을 보호하기 위한 것으로 이해된다.

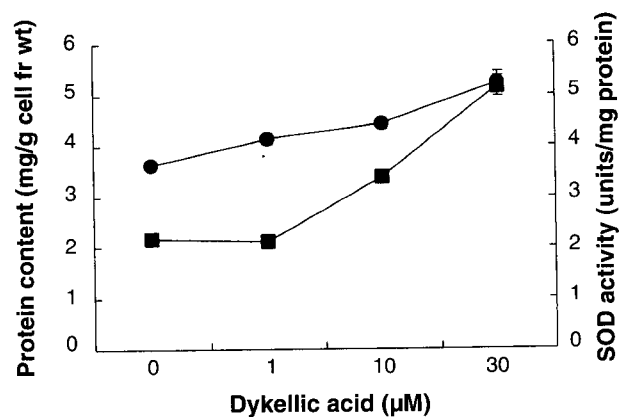


Figure 3. Effects of dykellic acid on the protein contents (- ■ -, mg/g cell fresh wt) and the superoxide dismutase activity (- ● -, units/mg protein) in suspension cultures of tobacco photomixotrophic cultured cells. The chemical was added to the medium at the subculture and the enzyme activity was investigated on 12 days after treatment.

Dykellic acid 처리에 따른 식물배양세포에서 다양한 종류의 항산화효소 활성과 저분자 항산화물질에 미치는 영향에 대하여 조사할 필요가 있다고 생각한다.

적 요

미생물에서 분리한 dykellic acid가 식물세포에 미치는 생리적 영향을 평가하기 위하여, 담배 광혼용영양배양세포 (photomixotrophic cultured cells, PM세포)에 dykellic acid를 다양한 농도로 처리하여 세포의 성장과 단백질 함량 및 superoxide dismutase (SOD) 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 담배 PM세포는 0.7 mg/L 2,4-D, 0.3 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 200 mM NaCl를 함유한 MS배지에서 25°C, 광조건에서 현탁배양 (100 rpm) 하였다. 계대배양시 화합물을 처리한 후 12일째의 세포성장 억제와 배지의 이온 전도도를 측정하여 세포막손상의 결과는 일치하였으며, 화합물은 세포생장을 강하게 억제시켰다 (IC₅₀, 약 20 µM). Dykellic acid 처리농도가 증가함에 따라 단위세포 무게당 단백질 함량과 SOD 비활성도를 현저히 증가시켰다. 이상의 결과로 dykellic acid는 식물세포 성장을 저해하는 활성을 가지고 있으며, 담배 PM세포는 적은 양으로도 천연물의 생리활성을 평가할 수 있는 유용한 생물소재임이 확인되었다.

사사: 본 연구는 과학기술부 선도기술개발과제 (HS2703)의 연구결과이다.

인용문헌

- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254
- Cha HC, Sohn JH, Kim KS, Choi KT, Lee KW (1993) Effect of NaCl on salt-tolerant callus in tobacco. *Kor J Bot* **36**:113-120
- Dalton CC (1980) The biotechnology of green-cell cultures. *Biochem Soc Trans* **8**:475-477
- Fuerst EP, Norman MA (1991) Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci* **39**:458-464
- Kwon HK, Kwon SY, Lee HS, Yoon ES, Kim JS, Cho KW, Kwak SS (1999) Responses of tobacco photomixotrophic cultured cells to various herbicides. *Kor J Plant Tiss Cult* **26**: 183-187
- Lee HJ, Lee CH, Chung MC, Chun HK, Rhee JS, Kho YH (1999) Dykellic acid, a novel apoptosis inhibitor from *Westerdykella multispore* F50733. *Tetrahedron Lett* **40**: 6949-6950
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte protein (Hemocuprein). *J Biol Chem* **244**:6049-6055
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Nishida K, Sato F, Yamada Y (1980) Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomixotrophically cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol* **21**:47-55
- Sandmann G, Kowalczyk-Schroder S, Taylor HM, Boger P (1992) Quantitative structure activity relationship of fluridone derivatives with phytoene desaturase. *Pestic Biochem Physiol* **42**:1-6
- Sato F, Takeda S, Yamada Y (1987) A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings. *Plant Cell Rep* **6**:401-404
- Sato F, Yamada Y, Kwak SS, Ichinose K, Kishida M, Takahashi N, Yoshida S (1991) Photoautotrophic cultured plant cells: A novel system to survey new photosynthetic electron transport inhibitors. *Z Naturforsch* **26c**:563-568
- Skehan P, Storeng R, Scudiero DA, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**:1107
- Yoshida S, Kwak SS, Takahashi N (1989) Biorational approaches in herbicide screenings for economic weed control. *Proceedings of the 12th Conference of the Asian-Pacific Weed Science Society*. Seoul. 81-87

(접수일자 2000년 2월 2일)