

## *Catharanthus roseus* 세포 배양액에 deuterium이 치환된 tabersonine을 사용한 vindoline 생합성 경로 연구

이 수 · 이향열<sup>†</sup>

창원대학교 화학시스템공학과, <sup>†</sup>한국교통대학교 생명공학과  
(2012년 2월 1일 접수 ; 2012년 3월 10일 수정 ; 2012년 3월 12일 채택)

### Studies of vindoline metabolism in *Catharanthus roseus* cell cultures using deuterium-labeled tabersonine

Soo Lee · Hyang-Yeol Lee<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Changwon National University, 641-773, Korea

<sup>†</sup>Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Korea

(Received February 1, 2012 ; Revised March 10, 2012 ; Accepted March 12, 2012)

**요약 :** *Catharanthus roseus*로부터 생산되는 빈카알칼로이드는 암을 치료하는 데에 사용되는 가장 중요한 천연물 중의 하나이다. 이러한 항암제는 두 단량체 인돌 알칼로이드인 catharanthine과 vindoline의 결합으로 합성될 수 있다. 이 중 vindoline의 생합성에 관계하는 경로를 조사하기 위해서 tabersonine의 메틸기에 중수소를 치환한 전구체인 tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**를 합성하였다. 이는 중수소의 질량 증가로 인해 자연에서 발생하는 tabersonine과 뚜렷이 구별될 수 있도록 해 준다. 우리는 이 중수소가 치환된 tabersonine **1a**가 성공적으로 vindoline 생합성경로에 편입되어 중수소가 치환된 3개의 새로운 vindoline 중간체(**2a**, **3a**와 **4a**)를 생성함을 보였다. 세포현탁배양액에 tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**를 주입한 5일과 13일째에 생성된 대사물질인 16-Hydroxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 356) **2a**, 16-Methoxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 370) **3a**와 16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 388) **4a**의 생성량을 UPLC/MS를 사용하여 측정하였다. 출발물 **1a**에서 생성물 **2a**, 그리고 **2a**에서 **3a**로의 전환은 빨랐던 반면 **3a**에서 **4a**로의 전환은 상대적으로 훨씬 느렸다. 따라서 각 대사물질들의 상대적 전환속도를 서로 비교해 보았을 때 vindoline 생합성 과정의 첫 세 단계 중에서 가장 느린 마지막 단계가 속도결정단계임을 암시한다. 즉 대사물 **3a**에서 **4a**로의 느린 전환속도의 결과, 배양 후 13일까지도 **3a**의 축적률이 현저히 증가됨을 보였다. 배양 5일째의 대사물 **2a**, **3a**와 **4a**의 축적비는 각각 1, 2와 0.1이었다. 그러나 desacetoxyvindoline-CD<sub>3</sub> **5a**, deacetylvindoline-CD<sub>3</sub> **6a**와 vindoline-CD<sub>3</sub> **7a**의 피크는 배양 13일 후에도 발견되지 않아 세포현탁 배양액에 각 생합성단계와 관련된 효소들이 존재하지 않음을 알 수 있었다.

**Abstract :** Vinca alkaloids produced from *Catharanthus roseus* are one of the most important natural product drugs in treatments of human cancers. These anticancer drugs are derived from coupling of the two monomeric indole alkaloids, catharanthine and vindoline. In order to investigate vindoline biosynthesis, tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a** is synthesized to use as a deuterium labeled precursor, which is distinguished clearly from the natural counterpart. We show that these deuterium labeled tabersonine **1a**

<sup>†</sup>교신저자 (E-mail : hyl@cjnu.ac.kr)

are successfully incorporated into the vindoline biosynthetic pathway to yield three deuterated vindoline intermediates. 16-Hydroxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 356) **2a**, 16-Methoxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 370) **3a**, 16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 388) **4a** are produced from the cell suspension culture measured by UPLC/MS at 5 and 13 days after feeding tabersonine. The conversion rates from **1a** to **2a** and **2a** to **3a** are fast, whereas that from **3a** to **4a** is much slower. This indicates that the rate determining step among the first three vindoline biosynthesis is the last step. As a result of the slow conversion rate from **3a** to **4a**, the accumulation level of 16-Methoxytabersonine-CD<sub>3</sub> **3a** is significantly increased up to 13 days. The accumulation ratio among **2a**, **3a** and **4a** is 1, 2 and 0.1 at 5 days. However, the peaks of desacetoxylvindoline-CD<sub>3</sub> **5a**, deacetylvindoline-CD<sub>3</sub> **6a** and vindoline-CD<sub>3</sub> **7a** are not found from the cell extracts even after 13 days of incubation which may indicate no presence of their corresponding enzymes.

*Keywords* : *Catharanthus roseus*, *vindoline biosynthesis*, *deuterium-labeled tabersonine*, *metabolic profiling*.

## 1. 서론

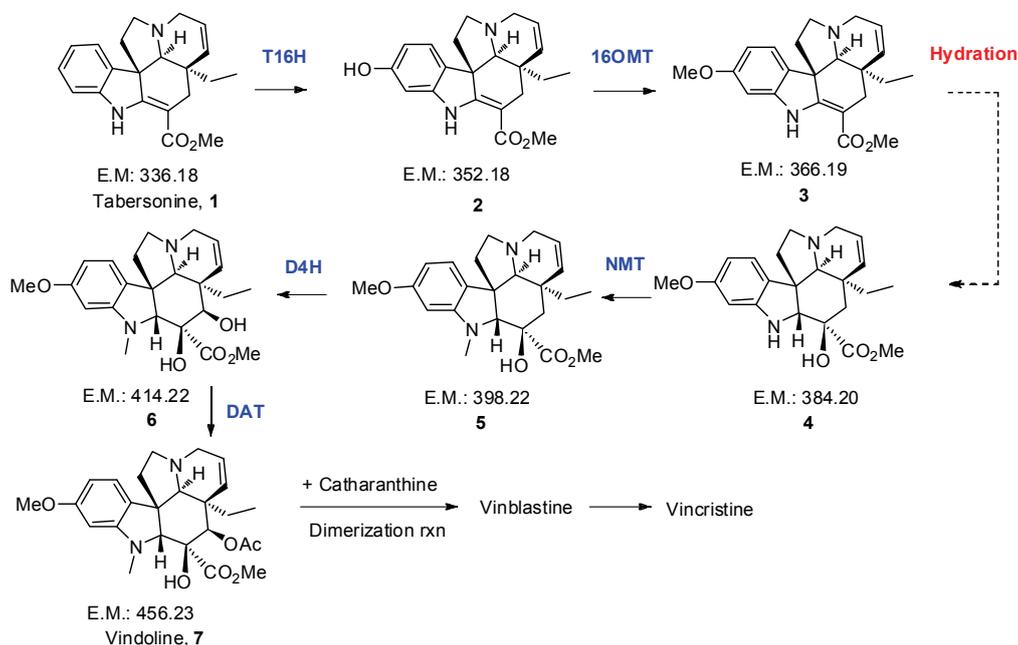
약용식물 *Catharanthus roseus* (Fig.1)는 현재 임상에서 사용되고 있는 항암제인 vincristine과 vinblastine, vindesine 그리고 vinorelbine 등을 생산하는 중요한 식물로써 지난 수 십년 동안 많은 연구가 있어왔다[1~3]. 이 식물이 생산하는 천연물 항암제들은 모노터펜 알칼로이드인 catharanthine과 vindoline의 이합체 반응을 통해 만들어진다. 이 두 중간체 알칼로이드 중 cell culture를 통한 catharanthine의 축적은 잘 알려져 있으나 vindoline을 안정적이면서 대량 생산할 수 있는 bioprocess의 산업적 적용은 아직까지 알려진 바가 없다. 특히 cell culture가 아닌 이 식물의 shoot culture를 이용할 경우 catharanthine과 vindoline을 모두 생산할 수 있으며 이 알칼로이드들의 이합체인 vinblastine도 합성되는 것으로 알려져 있다. 그



Fig. 1. Medicinal plant, *Catharanthus roseus*.

러나 shoot culture는 hairy root나 cell suspension culture에 비해 성장 속도가 상대적으로 느리기 때문에 알칼로이드의 상업적인 생합성에 이용하기는 어렵다. 따라서 vinca 항암제를 합성하는데 사용되는 주재료인 vindoline은 식물의 잎으로부터 전적으로 얻어지고 있는 실정이다[4-6].

본 연구는 cell suspension culture를 이용하여 임상에서 많이 사용되는 인돌계 항암제, 빈블라스틴과 빈크리스틴을 합성하는데 반드시 필요한 중요 중간체인 vindoline의 생합성 경로와 그 과정에 생성되는 중간체들의 분포에 대해 조사하였다 (Scheme 1). 일반적으로 vindoline 생합성 경로를 연구하기 위해서는 중간체인 tabersonine을 도입하여 그 대사과정 중에 발생하는 생성물들을 확인하는 과정을 거친다[8]. 그러나 이러한 방법은 cell culture를 배양하는 과정 중에 vindoline 생합성과정의 대사물이 이미 존재하기 때문에 인위적으로 첨가한 출발물인 tabersonine의 대사생성물과 식물 자체적으로 생산한 생성물간의 구분이 사실상 불가능하다. 우리는 tabersonine의 methyl기에 deuterium이 3개가 치환된 tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**를 합성하였다. Deuterium이 치환된 tabersonine을 cell suspension culture에 첨가한 이후 생성된 대사물의 질량이 각각 3Da 증가한 화합물을 질량분석기로 손쉽게 관측할 수 있으므로, 기 존재하는 vindoline 생합성 경로에 있는 대사산물과 새롭게 생성된 대사물을 쉽게 구별할 수 있다. 고정밀의 ultra-performance LC/MS와 3개의 deuterium이 치환된 출발물 **1a**를 사용하여, vindoline의 생합성



Scheme 1. Established biochemical conversions starting from tabersonine in vindoline biosynthesis. **2**: 16-Hydroxytabersonine, **3**: 16-Methoxytabersonine, **4**: 16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine, **5**: deacetoxyvindoline, **6**: deacetylvindoline. E.M. = exact mass. Solid black arrows indicate steps for which a corresponding cDNA has been characterized. An enzyme responsible for hydration of **3** (dotted arrow) has not been detected. Abbreviation: **T16H**, tabersonine 16-hydroxylase; **16OMT**, 16-hydroxytabersonine 16-*O*-methyltransferase; **NMT**, 16-methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine *N* methyltransferase; **D4H**, desacetoxyvindolin 4-hydroxylase; **DAT**, deacetylvindoline acetyltransferase.

과정에서 배양시간의 경과에 따라 출발물이 반응물로 전환되는 속도 및 생성물들의 분포도 등을 정밀하게 조사할 수 있었다.

## 2. 실험

### 2.1. 재료, 시약 및 기기

Tabersonine은 MIT의 O'Connor 교수로부터 받은 시약이며 CD<sub>3</sub>OD는 aldrich사의 NMR용 시약을 사용하였다. NaOH 및 유기용매인 MeOH, EtOH, Ethyl Acetate와 aq. HCl(~28%) 등은 대정화학 GR 제품을 정제없이 사용하였다. NMR은 Varian

500MHz, LC/MS는 Waters사의 Acquity UPLC system을 사용하였다.

### 2.2. Tabersonine-CD<sub>3</sub> (**1a**)의 합성

Tabersonine (4 mg, 1.2 mmol)을 10 mL의 0.1 M NaOH/CD<sub>3</sub>OD에 넣고 70 °C에서 교반하였다. 반응은 소량의 sample을 건조하여 <sup>1</sup>H-NMR을 측정하고 ester의 methyl기가 모두 사라졌을 때 0.1 M HCl수용액을 첨가하여 종료하였다. 용액의 pH를 8로 중화한 후 진공 농축기에서 용액을 건조하여 tabersonine-CD<sub>3</sub> (**1a**)를 80%의 수율로 얻었다 (Scheme 2)[8].

### 2.3. Deuterium-labeled tabersonine 1a의

#### 첨가 및 생성물의 추출

동일한 배치에서 나온 2개의 세포현탁 배양액을 같은 기간 배양 후 한 쪽은 기질 **1a**를 첨가하지 않고 통제된 기준 배양액으로 사용하였으며 다른 배양액은 합성된 기질 **1a**를 첨가하여 배양한 후 통제된 배양액에 존재하지 않고 새로이 생성된 대사물들을 비교하여 측정하였다.

합성된 tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a** (0.1 M in 150 mL EtOH)을 150 mL cell suspension culture에 첨가한 후 회전 배양기에서 배양하였다. 5일, 13일 후 약 20 mL의 셀을 걸러내어 증류수로 반복하여 세척하였다. 그리고 물기를 종이타올로 눌러서 제거한 후 3 g의 cell과 MeOH을 모르타르에 넣고 분쇄하였다. 추출된 MeOH용액은 건조한 후 Ethyl acetate/H<sub>2</sub>O로 분액한 후 유기층을 모아 다시 건조하였다. 남은 고체는 5 mL MeOH에 녹인 후 0.3 mm pore size를 가진 syringe filter를 사용하여 침전물을 제거한 후 LC/MS에 직접 주입하여 생성물의 분포를 Fig. 2와 같은 방법을 사용하여 조사하였다[9].

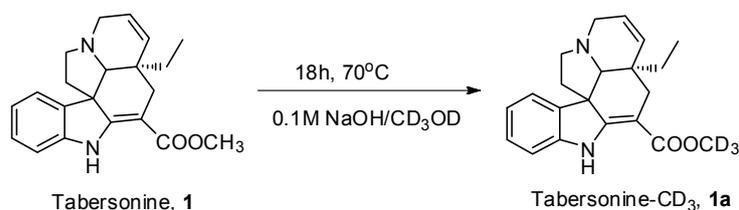
### 2.4. UPLC/MS 분석

시료는 ESI에 의해 이온화시켜 Micromass LCT Premier TOF Mass spectrometer로 분석하였다.

LC는 Acquity Ultra Performance BEH C18, 1.7 mm, 2.1 x 100mm 칼럼을 사용하였으며 용매는 0.1% formic acid를 포함한 acetonitrile/water 전개 용매를 사용하여 0.25 mL/min의 속도로 전개하였다. Gradient elution으로 20 min동안 전개하였다. Capillary와 sample cone voltage는 각각 2000 V와 30 V였다. 디솔베이션과 소스 온도는 각각 350°C와 100°C였다. LC/MS 스펙트라는 Mass Lynx 4.1 프로그램을 사용하여 얻었다.

## 3. 결과 및 고찰

합성된 기질 Tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**를 세포현탁 배양액에 첨가하여 관련된 효소에 의해 생성되는 대사물들을 조사하기 위하여 우리는 먼저 동일한 배치에서 나온 2개의 세포현탁 배양액을 같은 기간 배양 후 한 쪽은 기질 **1a**를 첨가하지 않고 통제된 기준 배양액을 준비하였다. 또 다른 배양액은 합성된 기질 **1a**를 첨가하여 배양한 후 적당한 시간에 따라 추출하여 대사 생성물들을 조사하였다. 현재까지 연구된 결과에 의하면 vindoline 생합성경로의 출발물인 Tabersonine **1**은 16-Hydroxytabersonine **2**, 16-Methoxytabersonine **3**, 16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine **4**



Scheme 2. Synthesis of tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**.

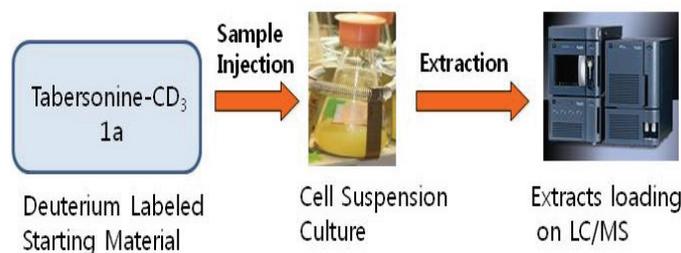


Fig. 2. Procedures for metabolic profiling with deuterium-labeled tabersonine **1a**.

의 순서로 전환되어 최종적으로는 vindoline이 합성되는 것으로 알려져 있다. 우리는 tabersonine 1의 methyl ester를 CD3OD (중소소가 치환된 메탄올)로 치환시킴으로서 질량이 각각 3Da 증가한 tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**를 합성하였다. 따라서 tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**가 생합성 경로를 거쳐 전환될 경우 질량이 3Da이 증가한 **2a** (355 Da), **3a** (369 Da) 그리고 **4a** (387 Da)의 순으로 생성될 것이다. 현재 발견된 130개 이상의 Catharanthus alkaloids 중에 질량 355 Da, 369 Da 그리고 387 Da을 가지는 천연물은 보고된 바가 아직 없다. 그렇다 하여도 동일한 질량의 화합물이 발견될 만일의 경우를 대비하여 먼저 기질을 첨가하지 않고 통제된 상태의 배양액을 메탄올로 추출하여 LC/MS로 분석하여 보았다. 그 결과는 예상했던 바와 같이 질량 356 (M+H), 370 (M+H) 그리고 388 (M+H)에 해당하는 피크는 검출 되지 않음을 Fig. 3에서 보여 주고 있다.

Tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a** (m/z 340)를 세포현탁 배양액에 첨가하고 각각 5일, 13일 후 메탄올로 추출하여 그 추출물을 UPLC/MS에 주입한 후 생성물을 조사하였다. 5일 후 cell을 추출하여 LC/MS로 분석한 결과 16-Hydroxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 356) **2a**, 16-Methoxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 370) **3a**, 16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 388) **4a**에 해당하는 피크가 figure 4의 (E), (D), (C)에 각각 잘 나타났으나 desacetoxyvindoline-CD<sub>3</sub> (m/z 402) **5a**와 deacetyl vindoline **6a**, 그리고 Vindoline **7a**의 피크는 나타나지 않았다. Figure 4 (F)에 보는 바와 같이 첨가한 출발물인 tabersonine-CD<sub>3</sub>에 해당하는 m/z 340 피크는 배양액에 첨가한 지 5일 후에는 거의 사라졌으며 m/z 356의 질량을 가지는 화합물 **2a**와 m/z 370을 갖는 **3a**이 주요한 생성물로서 검출되었으며 동시에 m/z 388의 질량을 갖는 **4**의 피크가 나타나기 시작하였다.

Fig. 4의 C, D, E에서 새로이 검출된 각각의 피크의 exact mass spectrum을 확대하여 살펴본 결

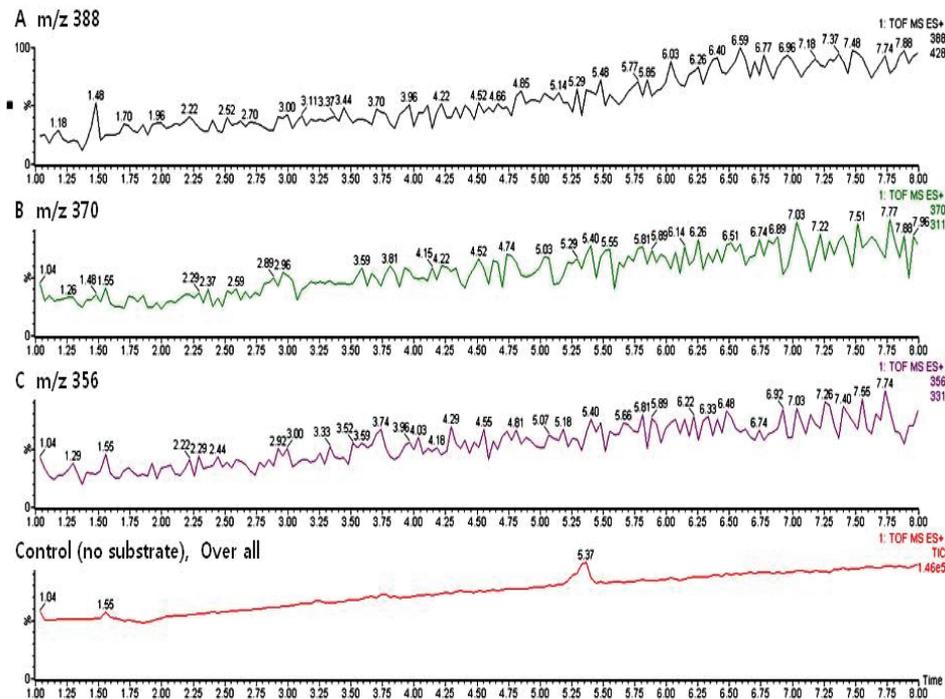


Fig. 3. LC/MS spectra of the cell suspension culture extract without substrate **1a** as a control.

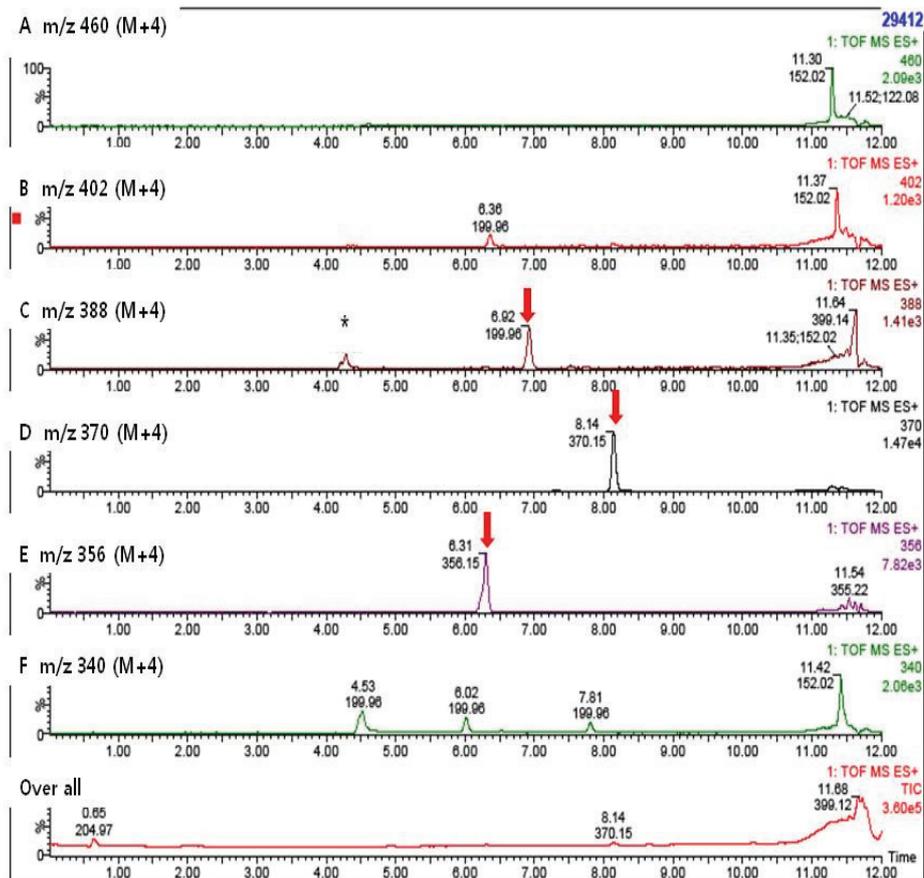


Fig. 4. LC/MS spectra showing production of  $CD_3$ -labeled compounds from the *C. roseus* cell extract at 5 days after supplemented with  $CD_3$ -labeled tabersonine. Peaks at C, D and E indicate deuterated compounds derived from  $CD_3$ -labeled tabersonine in vindoline biosynthesis. Starred peak already exists in control.

과 모체의 질량이 각각 388, 370 그리고 356에 해당하는 **2a**, **3a**와 **4a**임을 확인할 수 있었다. 그러나 질량이 402에 해당하는 것으로 추정되는 Fig. 4의 B (6.4분경에 보이는 피크)의 exact mass spectrum을 살펴본 결과 m/z 402에 해당하는 질량의 피크는 나타나지 않아 **5a**는 형성되지 않았음을 알 수 있었다. 이 결과는 Fig. 5에 나타내었다.

16-Hydroxytabersonine **2**의 합성은 tabersonine 으로부터 vindoline이 생합성 되는 경로의 첫 단계에 해당한다. Cytochrome P-450 monooxygenase

인 tabersonine 16-hydroxylase (T16H)에 의해 tabersonine은 **2**로 전환된다[10]. Deuterium이 치환된 화합물 **1a**를 배양액에 첨가한 지 13일 후에는 출발물 **1a**와 그 대사물인 **2a**의 피크가 LC상에 거의 나타나지 않아 모두 소모되어 vindoline 생합성 경로에 완전히 진입되었음을 알 수 있었다. 16-Methoxytabersonine **3**은 vindoline 생합성 경로의 두 번째 단계로서 **2**로부터 합성이 일어난다. 따라서 **2a**가 소모됨에 따라 대사산물인 화합물 **3a**의 점차적인 축적이 일어남을 Table 1과 Fig. 6에서

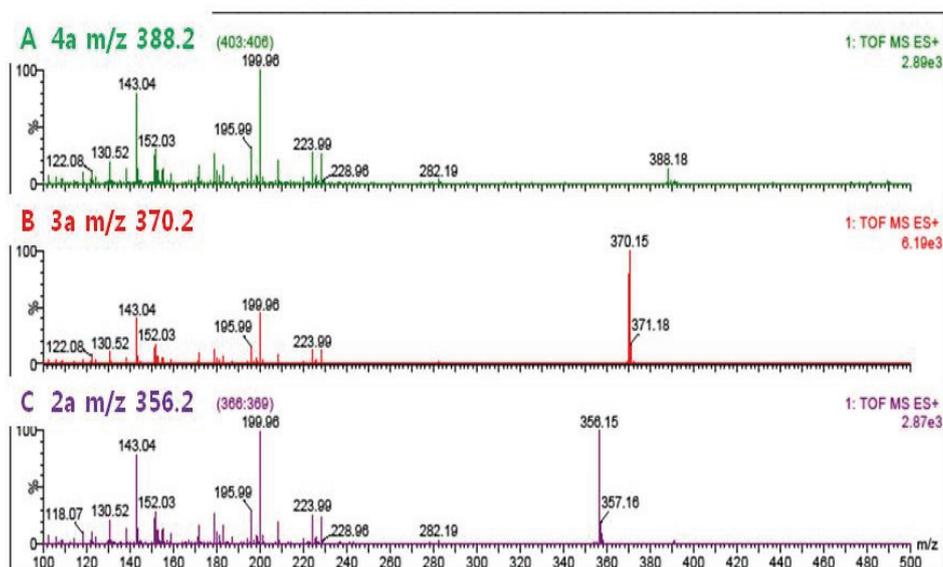


Fig. 5. Exact mass spectra of deuterated compounds for extract components at 5 and 13 days after feeding tabersonine- $\text{CD}_3$  **1a**. A, B and C show mass spectra of newly formed deuterated metabolites, **2a** ( $m/z$  356.2,  $M+4$ ) **3a** (370.2,  $M+4$ ) and **4a** (388.3,  $M+4$ ), respectively.

Table 1. UPLC/MS Data of Cell Extracts at 5 and 13 Days After Feeding Tabersonine- $\text{CD}_3$  **1a**

Cpd #	Name	$m/z$ ( $M+4$ )	RT (min)	Ion Count ( $\times 10^2$ )		Relative Percentage (%)	
				5day	13day	5day	13day
<b>1a</b>	Tabersonine- $\text{CD}_3$	340.2	7.84	2.3	–	1	0
<b>2a</b>	16-hydroxytabersonine- $\text{CD}_3$	356.2	6.32	66.4	–	34	0
<b>3a</b>	16-methoxytabersonine- $\text{CD}_3$	370.2	8.18	120.6	64.0	62	74
<b>4a</b>	16-methoxy-2,3-dihydro-tabersonine- $\text{CD}_3$	388.2	6.97	6.4	22.6	3	26
<b>5a</b>	desacetoxyvindoline- $\text{CD}_3$	402	–	ND	ND	ND	ND

\* RT = retention time, ND = not detected

잘 보여주고 있다. 즉 세포배양액에 **1a**를 첨가한 후 5일 째에 추출물에서 관측된 **1a**, **2a**, **3a** 그리고 **4a**의 이온 갯수는 각각  $2.3 \times 10^2$ ,  $66.4 \times 10^2$ ,  $120.6 \times 10^2$  그리고  $6.4 \times 10^2$ 이었다. 즉 상대 백분율로 얘기하면 출발물 **1a**가 배양액에서 **3a**로 62%가 전환되는 동안 **4a**로는 단지 3%만이 생성되었다. 이는 출발물 **1a**에서 생성물 **2a**와 **3a**로의 축적은 비교적 빠른 시간에 이루어지고 있으나 **3a**에서 **4a**로의 전환은 상대적으로 매우 느리게 일어남에 따라 세 번째 단계의 병목현상에 의해 **3a**의 축적이 지속적으로 일어남을 의미한다. 배양시간에 따른 각 생성되는 대사물의 상대 백분율을 쉽게 비교하기 위해 3차원의 그래프로써 Fig. 6에 나타내었다.

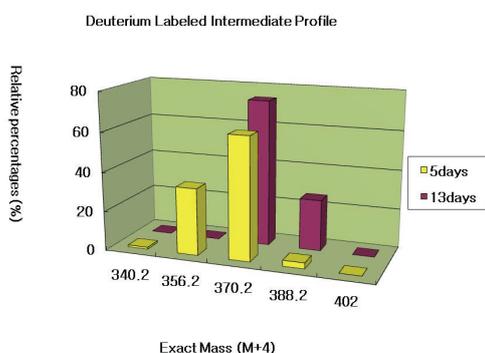


Fig. 6. Relative percentages of deuterium-labeled intermediates in the vindoline biosynthetic pathways at 5 and 13 days after feeding with deuterium-labeled tabersonine. Exact Mass of tabersonine- $CD_3$  **1a** (m/z 340), 16-Hydroxytabersonine - $CD_3$  **2a** (m/z 356), 16-Methoxytabersonine- $CD_3$  **3a** (m/z 370), 16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine- $CD_3$  **4a** (m/z 388) and desacetoxylvindoline- $CD_3$  **5a** (m/z 402) are shown on x axis.

Vindoline 생합성의 세 번째 단계는 **3**으로부터 16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine **4**의 합성이다. Vindoline 생합성 경로에서 수화반응에 관여하는 효소는 아직까지 밝혀지지 않고 있으며 또한 이 반응이 단순히 자발적인 수화반응일 가능성에 대한 일부의 의견도 있다[11-13]. 일반적으로는 **4a**에서 **5a**로의 전환에 관여하는 *N*-methyltransferase (NMT)에 의한 효소반응이

속도결정 단계로 알려져 있으나 우리가 사용한 세포현탁배양액의 식물세포는 **4a**에서 vindoline까지의 합성에 관계하는 효소들이 존재하지 않아 수화반응(**3a**에서 **4a**로 전환)과 NMT에 의한 반응(**4a**에서 **5a**로 전환)의 속도를 직접적으로 비교할 수는 없었다. 그러나 seedling을 이용하여 본 실험과 같은 방법으로 조사할 경우에는 모든 단계의 효소들이 seedling에 존재하므로 각 효소반응 단계의 속도에 대한 직접적 비교가 가능할 것으로 추측된다.

**4a**에서 **5a**로의 전환은 NMT에 의해 촉매되는 methyl화 반응이다[15]. 13일간의 배양 후에도 **5a**의 생성은 확인되지 않아 이 효소에 의한 촉매반응은 일어나지 않는 것으로 보인다. 최근 연구결과에 의하면, 우리가 배양하고 있는 cell의 gene library를 구축하여 조사한 결과 이 NMT를 발현하는 유전자는 발견되지 않았다(우리의 발표되지 않은 자료). 그 이유는 정확히 밝혀지지 않았으나 결과적으로는 NMT가 발현되지 못하기 때문에 **5a**로 전환되지 못한다는 점에서 본 연구의 결과와 일치한다고 할 수 있다. 따라서 vindoline의 생합성의 마지막 3단계에 관계하는 NMT에서 deacetylvindoline-4-hydroxylase (D4H)와 desacetylvindoline-4-*O*-acetyltransferase (DAT)까지의 모든 효소가 발현되지 못하므로 **5**에서부터 vindoline까지의 알칼로이드가 생성되지 못하는 것으로 보인다. 이것은 cell line이 아직 stem cell과 같은 상태로서 각각의 조직으로 분화되지 못했기 때문인 것으로 추정된다. 특히 *C. roseus*의 잎에 존재하는 여러 종류의 cell 조직 중에 **5**, **6** 그리고 vindoline **7**의 합성에 관여하는 효소는 idioblast/laticifer cell에서만 존재하며 다른 epidermal cell, mesophyll cell에는 발견되지 않았다[5]. 따라서 idioblast/laticifer cell로 분화되지 않은 cell culture 상태에서는 해당 효소가 거의 발현되지 않는 것으로 보인다. 본 연구결과와 마찬가지로 대부분의 경우 모상근 배양액이나 세포현탁 배양액에서 vindoline이 생성되지 않았음을 보고하였다[14]. 예외적으로 몇몇 root culture line에서 미량의 vindoline 및 vinblastine이 존재함이 보고되었으나 이 알칼로이드들이 hairy root에서 실제로 합성이 된 것인지, 모체인 seedling 등에 존재하던 알칼로이드에서 유래한 것인지, 또는 다수의 재배양을 거치면서 오랜 기간에 걸쳐 생성되었는지는 논란이 있는 것으로 보인다[6].

지금까지의 결과를 요약하면 deuterium이 치환

된 tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**를 세포현탁 배양액에 첨가한 후 고정밀의 UPLC/MS를 사용하여 질량이 각각 3Da 증가한 대사산물 **2a** ~ **4a**가 생성됨을 보였다. 또한 각 대사물 **1a** ~ **4a**이 배양시간에 따라 소모되고 생성되는 과정에 따른 생성 분포도를 보였으며, 동시에 각 대사 산물들의 검출량에 근거하여 vindoline 생합성의 첫 세 단계의 상대적인 전환속도를 비교함으로써, 결과적으로 수화효소(또는 자발적 반응)가 촉매하는 마지막 단계의 반응속도가 가장 느림을 알 수 있었다. 그리고 화합물 **4a** 이후의 대사물이 관측되지 않았으므로 우리가 사용한 세포현탁 배양액에는 관련된 효소가 존재하지 않음을 알 수 있었다. 또한 지금까지는 tabersonine의 수화효소가 발견되지 않아 다른 vindoline 생합성 경로에 존재하는 효소들과의 반응속도를 직접적으로 비교하는 것이 불가능하였다. 따라서 본 연구는 세포현탁배양액, deuterium이 치환된 출발물과 고정밀의 UPLC/MS를 사용하여 배양시간에 따른 생성물들의 양을 직접 측정함으로써 vindoline의 초기 세단계의 반응속도를 비교한 최초의 연구 결과라는 점에서도 그 의미가 크다고 할 수 있다.

#### 4. 결론

Tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a** (m/z 340)를 합성하고 이 deuterium이 치환되어 있는 전구체를 출발물로 사용하기 위해 cell suspension culture에 첨가한 후, 생성된 이차 대사물을 추출하여 vindoline 생합성 경로를 LC/MS로 조사한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Tabersonine-CD<sub>3</sub> **1a**는 성공적으로 vindoline 생합성 과정에 도입되어 각각의 질량에 해당하는 피크를 가지는 16-Hydroxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 356) **2a**, 16-Methoxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 370) **3a**, 16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine-CD<sub>3</sub> (m/z 388) **4a**를 생성함을 LC/MS로 확인하였으며, 따라서 첫 세 반응에 각각 관여하는 효소인 T16H, 16OMT와 수화반응 효소(아직 알려지지 않음)가 존재함을 알 수 있었다.
2. LC/MS를 이용하여 배양 시간에 따른 생합성 단계별 생성물들의 생성량에 측정된 결과, vindoline 생합성경로의 첫 세단계에서 관련 효소에 의해 생성되는 대사 생성물들의 전환속도는 생성된 대사산물 **1a**에서 **2a**로, 또 **2a**에서

**3a**으로의 전환은 빠른 반면 **3a**에서 **4a**로의 전환은 상대적으로 매우 느렸다. 따라서 가장 느린 세 번째(수화반응) 단계가 vindoline 생합성 경로에서 전체 반응을 조절하는 속도결정단계에 해당되는 것으로 추정된다.

3. 배양 5일 후에 나타난 대사과정 생성물인 **2a**: **3a**: **4a**의 분포 비는 각각 10 : 20 : 1, 그리고 13일 후에는 **2a**는 **3a**로 완전히 전환되어 검출되지 않았으며 **3a**와 **4a**만이 약 3 : 1의 비로 측정되었다.
4. 배양한지 13일 후에도 대사과정 마지막 단계의 생성물들인 desacetoxyvindoline-CD<sub>3</sub> **5a**과 deacetylvindoline-CD<sub>3</sub> **6a** 그리고 vindoline-CD<sub>3</sub> **7a**에 해당하는 피크가 나타나지 않아 우리가 사용한 cell 배양액이 이러한 대사산물들을 생성하지 않으며, 이 결과로부터 이들 화합물들의 생합성에 각각 관여하는 효소들인 NMT, D4H와 DAT가 존재하지 않음을 알 수 있었다.

#### 감사의 글

이 논문은 2012년도 한국교통대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행한 연구임.

#### 참고문헌

1. J. Roepke, V. Salim, M. Wu, A. M. K. Thamm, J. Murata, K. Ploss, W. Boland, and V. De Luca, Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. *PNAS*, **107**, 15287 (2010).
2. R. van der Heijden, D. I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard and R. Verpoorte, The Catharanthus Alkaloids: Pharmacology and Biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 607 (2004).
3. H-Y. Lee, N. Yerkes, and S.E. O'Connor, Aza-Tryptamine Substrates in Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis. *Chemistry & Biology*, **16**, 1225 (2009).
4. S. Mahroug, V. Courdavault, M. Thiersault, B. St-Pierre, V. Burlat, Epidermis is a pivotal site of at least four secondary

- metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. *Planta*, **223**, 1191 (2006).
5. J. Murata, J. Roepke, H. Gordon, and V. De Luca, The Leaf Epidermome of *Catharanthus roseus* Reveals It's Biochemical Specialization. *The Plant Cell*, **20**, 524 (2008).
  6. R. Bhadra, S. Vani, and J. V. Shanks, Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Bioengineering*, **41**, 581 (1993).
  7. J. A. Morgan, J. V. Shanks, Inhibitor studies of tabersonine metabolism in *C. roseus* hairy roots. *Phytochemistry*, **51**, 61 (1999).
  8. S. Auriola, T. Naaranlahti and S. P. Lapinjoki, Synthesis of [methyl-2H]-labelled ajmalicine, yohimbine, tabersonine and catharanthine. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, XXIX, 117(1990).
  9. A. Verma, K. Hartonen, and M-L. Riekkola, Optimisation of Supercritical Fluid Extraction of Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus* using Experimental Design Methodology-Comparison with other Extraction Techniques. *Phytochemical Analysis*, **19**, 52 (2008).
  10. B. St-Pierre and V. De Luca, A Cytochrome P-450 Monooxygenase Catalyzes the First Step in the Conversion of Tabersonine to Vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.*, **109**, 131 (1995).
  11. E. De Carolis and V. De Luca, Purification, Characterization, and Kinetic Analysis of a 2-Oxoglutarate-dependent Dioxygenase Involved in Vindoline Biosynthesis from *Catharantus roseus*. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**, 5504 (1993).
  12. S. Hisiger and M. Jolicoeur, Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. *Phytochem Rev.*, **6**, 207 (2007).
  13. S. Rodriguez, V. Compagnon, N. P. Crouch, B. St-Pierre and V. De Luca, Jasmonate-induced epoxidation of tabersonine by a cytochrome P-450 in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, **64**, 401 (2003).
  14. E. Hernandez-Doninguez, F. Campos-Tamayo, M. Carrillo-Pech, and F. Vazquez-Flota, In *Catharanthus roseus* Shoot Cultures for the Production of Monoterpenoid Indole Alkaloids; Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 349 (2005).
  15. D. K. Liscombe, A. R. Usera, and S. E. O'Connor, Homolog of tocopherol *C* methyltransferases catalyzes *N* methylation in anticancer alkaloid biosynthesis. *PNAS*, vol. **107**, no. **44**, 18793 (2010).