

세포배양 및 형질전환체 배양에서 방사선을  
이용한 Shikonin 생산증대

Enhancement Effect of Shikonin in Cell Suspension  
Culture and Transferrant Culture by  
Radiation Application

*KAERI*

# 제 출 문

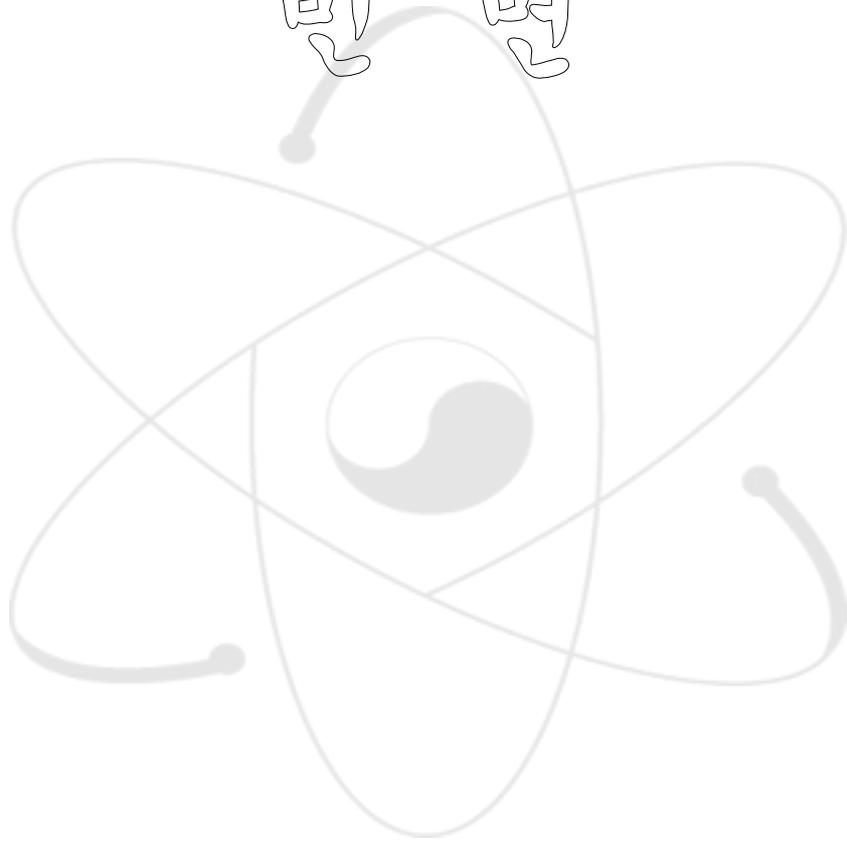
한국원자력연구소소장 귀하

본 보고서를 2003년도 자체연구개발사업 “세포배양 및 형질전환체 배양에서 방사선을 이용한 Shikonin 생산증대 효과” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004. 10.

연구기관명 : 한국원자력연구소  
연구책임자 : 김 채 성  
연구원 : 이 영 근  
          정 병 엽  
위탁책임자 : 이 영 복  
연구원 : 황 혜 연

비명



# 요 약 문

## I. 제 목

세포배양 및 형질전환체 배양에서 방사선을 이용한 Shikonin의 생산증대 효과

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 생물공학의 급속한 발전에 따라 그 기법을 산업에 효과적이고도 유용하게 이용하고자 하는 연구가 광범위하게 시도되고 있다. 특히 인체에 사용되고 있는 물질이나 색소의 경우에 있어서 현재까지는 유기합성 물질의 이용이 주종을 이루어 왔었으나 건강이나 환경문제에 있어 합성 물질의 유해성이 문제시되면서 천연물인 Bio-products의 활용에 대한 관심도가 높아지고 또한 절실하게 요구되고 있는 실정이다. 따라서 생물체로부터 생성되는 천연물질이나 천연색소를 그대로 이용하기 위해서는 생체의 조직이나 세포단위에서의 생성물의 합성 및 분비의 양을 보다 증가시키기 위한 기술의 개발이 확립되어야 할 필요가 있다.

약용식물인 지치(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb.)에서 합성되어 의약품원료, 천연화장품원료 및 천연염료로 다양하게 쓰이는 붉은 색소는 1,4-naphthoquinone인 shikonin이 주성분으로 최근 이 물질에 대한 관심도가 지대하게 높다.

2차대사물로 적색을 띄는 shikonin과 그 계열 화합물인 deoxyshikonin, acetylshikonin, isobutylshikonin,  $\beta,\beta$ -dimethylacrylshikonin, isovalerylshikonin,  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin 등은 지치의 근부조직에서 합성되고 있는데, 이 물질들의 합성은 지치의 근부

조직인 cork층에서만 국한적으로 합성되는 것으로 생체내에서의 shikonin 생산증대에 대한 기대가 어려워지면서 세포배양기술의 도입 가능성이 제시되었다. 그러나 지치에서의 shikonin이나 그 계열의 물질은 식물의 전 생육기간을 통해 합성되는 것이 아니라 주로 뿌리의 노화된 cork층에서만 국한적으로 합성되는 2차대사물인 관계로 양적으로 매우 소량이어서 shikonin을 생산하는데 세포의 대사활동에서 체내 효소의 활성에 적합한 환경조건을 밝히고 이 조건을 부여할 수 있다면 세포주의 현탁배양으로 shikonin을 공업적으로 대량생산할 수 있는 부가가치가 매우 높은 물질로 알려져 있다.

따라서 식물의 생육촉진 자극효과 뿐만 아니라 세포단위에서의 효소활력 및 2차대사물(Secondary product)에서의 효과도 인정되고 있는 저선량의 방사선을 세포배양에 이용함으로써 세포의 대사기능을 보다 활성화시켜 shikonin의 생산을 증대시킬 수 있는 가능성을 기대할 수 있다. 그러나 방사선 조사의 특이성으로 인한 재현성에 다소의 난관이 있으므로 이에 대한 정확한 방사선의 조사범위 및 조사방법을 확립하여 안정적으로 식물의 천연 2차대사물 생산에 방사선의 이용범주를 확대시킬 필요가 있다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2002)	지치세포배양기술 및 저선량 조사기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Shikonin의 대량생산 우량 세포주의 지속적인 선발</li> <li>○ 지치의 Cell Suspension Culture로 Shikonin 생산성 향상 검토               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cell Suspension Culture에 의해 생산된 Shikonin의 정제</li> <li>- 세포의 Bioreactor Culture System 개발에 의한 Shikonin 대량생산 대형화 기반 조성</li> </ul> </li> <li>○ 세포현탁배양시 배양조건에 따른 체내효소의 활성 증대에 관한 검토               <ul style="list-style-type: none"> <li>- GHQ-3''-hydroxylase의 활성</li> <li>- HB-o-glucosyltransferase의 활성</li> <li>- HB-o-glucosidase의 활성</li> </ul> </li> </ul>
2차년도 (2003)	형질전환체 배양을 통한 Shikonin의 대량생산 및 저선량 방사선 이용기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 지치의 형질전환을 위한 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>의 gene transformation               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vector Construction</li> </ul> </li> <li>○ 지치 seedling 및 우량세포주에의 <i>Arhizogenes</i> infection</li> <li>○ Hairy roots의 분화 유도</li> <li>○ 저선량 방사선 조사에 의한 Hairy root의 분화 촉진효과               <ul style="list-style-type: none"> <li>- PCR에 의한 Transformation의 검정</li> <li>- Hairy root의 Northern hybridization</li> <li>- Hairy root의 GUS activity assay</li> <li>- Shikonin 생산성 검정</li> </ul> </li> <li>○ 저선량 방사선 조사에 의한 Hairy root의 체내효소 활성증대효과에 관한 검토               <ul style="list-style-type: none"> <li>- GHQ-3''-hydroxylase의 활성</li> <li>- HB-o-glucosyltransferase의 활성</li> <li>- HB-o-glucosidase의 활성</li> </ul> </li> </ul>

#### IV. 연구개발결과

본 실험은 지치의 callus를 배양하면서 callus의 성장 및 shikonin 유도체의 생성량이 우수한 세포주 679, 679-29 및 622-46의 세 line을 선별하였고, callus에 13선을 조사한 후 bioreactor를 이용한 세포현탁배양에서 생육촉진효과와 shikonin합성 효과를 조사하면서 이 때  $\text{Cu}^{2+}$ 와 jasmonate의 효과에 관하여도 검토하였다. 또한 저선량 13선 조사에 따른 shikonin합성의 변화의 원인 구명으로서 shikonin합성 대사과정에서의 주요 enzyme으로 작용하는 *p*-hydroxybenzoate geranyltransferase와 *p*-hydroxybenzoate glucosyltransferase의 활성을 조사하였다. 아울러 shikonin의 대량생산을 목표로 지치의 세포를 *Agrobacterium rhizogenes*로 형질전환시켜 hairy root를 발생시켰다.

Callus를 지속적으로 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 LS(Linsmeir and Skoog, 1965) 고체배지상에서  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 암조건에서 3주간격으로 지속적인 계대배양을 하면서 shikonin합성이 양호할 것으로 예측되는 세포주를 선별해 나간 결과 몇 가지의 세포주를 선별하였다.

이와 같이 선별된 세포주 들 중 고체배지상에서 shikonin 합성이 비교적 양호한 것으로 판단된 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 공시하여 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 LS고체배지에서 암배양할 때 callus의 증식이 완성하였을 뿐 아니라 callus에서의 shikonin 분비도 비교적 양호하였다.

이 들 각 세포주 10 g의 callus를 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 LS액체배지에서 암조건으로 3주간 배양한 후 세포의 증식과 shikonin 합성량을 측정 한 결과 생체중의 증가는 특히 622-46 line에서 가장 양호하였으나 고체배지에서의 생육보다는 세포의 생체중 증가속도

는 훨씬 저조한 편이었다. Shikonin의 생성에 있어서도 622-46 line에서 월등하게 높았다.

선발된 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 배양하면서 shikonin합성에 대한  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과를 조사하고, 아울러 jasmonate의 효과를 검토한 결과, M-9배지에서 622-46 line의 세포주에서 다른 line에 비해 shikonin의 합성이 현저하게 양호하였고,  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에 있어서는 1.0  $\mu\text{M}$ 의 처리에서 42%의 증가효과를 얻을 수가 있었으며, 이는 *p*-hydroxybenzoic acid가 *p*-hydroxybenzoic glucoside로 넘어가지 않고 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoate로 넘어가는 과정에서  $\text{Cu}^{2+}$ 가 촉진하는 효과가 있는 것으로 본다. 그러나  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에 있어서도 0.1  $\mu\text{M}$ 과 같은 저농도에서는 효과가 거의 없는 것으로 파악되었다.

Shikonin의 생합성에서의 methyl jasmonate의 효과에 있어서도 100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 경우 무처리제 비해 약 2배에 가까운 증가를 보였으며 특히 0.1  $\mu\text{M}$ 의  $\text{Cu}^{2+}$ 와 동시에 처리하였을 때에는 단독처리에 비해 다시 2배에 가까운 증가율을 보이고 있다. 이는 methyl jasmonate도  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에서와 같이 *p*-hydroxybenzoic acid가 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid로 넘어가는 과정을 촉진하는 것으로 본다.

이 결과로 볼 때 일반적으로 지치의 세포배양에서 shikonin을 생산할 경우에는 세포주의 증식단계에 이용하는 배지 및 환경조건과 shikonin 합성에 도입하는 배지 및 환경조건이 각각 다른 2단계 배양법을 사용하고 있지만 세포주의 선발에 따라 세포 증식배지인 LS배지에서의 배양만으로도 shikonin 생성의 유도가 충분히 가능한 것으로 확인되었다.

1차적으로 선발된 지치세포주 중 shikonin생성이 가장 양호한 것으로 판단된 622-46의 callus를 주종세포주로 결정하여 3주간 계대배양한 후 0, 2, 16 및 30 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 10 g의 크기로 500 ml의 LS액체배지에 넣어 3 L의 bioreactor에서 14일간 암조건으로 현탁배양

한 결과 배양배지와 배양세포로부터 매우 선명하고 깨끗한 색소물을 추출할 수가 있었다.

배양배지에서의 shikonin의 합성량은 2 Gy 조사구에서  $21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 다른 조사구에 비해 월등하게 높게 나타났고, 반면에 배양세포로부터 추출한 경우에는 배지용액의 경우와 다르게 16 Gy 조사구에서  $63.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 shikonin의 합성 및 축적이 현저하게 높았음을 보여주었다. 이상의 결과로 볼 때, 연구에서 shikonin 생산에 매우 유효성이 높은 세포주 622-46이 선발되었으며, 이 세포주를 사용할 경우 세포증식으로만 사용되는 LS배지에서도 shikonin의 생산에 있어 세포증식용 배지와 shikonin합성용 배지를 구분하여 세포를 배양하는 2원 배양법에서 탈피하여 동일배지에서의 연속배양에서도 공시세포주에 2 Gy나 또는 16 Gy의 저선량  $\gamma$ 선을 조사함으로써 아주 효율적으로 shikonin을 생산할 수 있을 것으로 확인되었다.

선발된 지치세포주 622-46의 callus를 공시하여 shikonin 합성에 효과가 가장 양호하였던 2 Gy의  $\gamma$ 선을 단독으로 조사한 후 10 g의 재료를 3 L의 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 LS 액체배지에 넣어 7 L의 bioreactor로 14일간 배양한 결과, 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 처리구에서 뚜렷한 효과를 보이고 있었다. 배지 용액과 배양 세포주를 분리하여 shikonin을 추출한 결과, 배지 내 용출된 shikonin의 양은  $1.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이었는데 비해 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 배양한 배지 내에서의 양은  $21.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 으로 현저한 차이를 보였으며, 배양 세포들로부터 추출한 shikonin의 양도 대조구의  $16.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에 비해 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 배양한 세포에서 추출한 shikonin의 양은  $21.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 으로 높은 수치를 보이고 있었다.

선발된 세포주 622-46의 callus를 주종세포주로 3주간 계대배양한 후에 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 10 g의 크기로 500 ml의 LS액체배지가 담

긴 5 L의 배양기에 넣어 2주간 배양을 하고, 배양 종료 후 PHB geranyltransferase와 PHB glucosyltransferase의 활성을 조사하였다.

PHB geranyltransferase는 shikonin의 합성과정에서 매우 중요한 역할을 하는 효소로서 배지조성이나 배양환경에 많은 영향을 받는다. 본 실험에서 볼 때 622-46의 세포주의 경우 LS배지에서도 PHB geranyltransferase가 어느 정도의 높은 활성을 보이고 있었으며, 2 Gy의 저선량  $\gamma$ -ray의 조사에 따라 약 68%의 증가율을 보였고, 16 Gy의 조사에서는 83%의 증가를 보여 세포주의 선발에 따라 이 효소의 활성을 높일 수가 있다는 것을 알 수 있었으며 특히 저선량의  $\gamma$ -ray의 조사에 따라 활성을 증대시킬 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

저선량의  $\gamma$ -ray의 조사에 따른 PHB glucosyltransferase의 활성에 있어서는 2 Gy에서 36.6 pkat와 16 Gy에서 38.2 pkat로 무조사구의 43.1 pkat에 비해 다소 감소하는 경향을 보이기는 하였지만 큰 변화를 볼 수가 없었다.

다음으로 *Agrobacterium rhizogenes*을 이용하여 지치를 형질전환시켜 hairy root를 발생시키기 위하여 intron을 가지고 있는 GUS( $\beta$ -glucuronidase) gene을 binary vector pBin19에 subclone하였다. 아울러 형질전환된 hairy root를 선발하기 위해 hygromycin phosphotransferase gene도 동시에 T-DNA 영역안에 삽입하여 이 둘 두 가지 gene을 갖는 binary vector를 작성하였다.

지치의 종자를 MS배지에 무균적으로 파종하여 25°C에 암조건으로 발아시킨 후 하배축을 채취하여 binary vector를 포함한 *A.rhizogenes* strain 15834를 접종하여 hairy root를 얻을 수가 있었다.

1개월 정도의 배양에서 hairy root가 발생한 후에 25 mg · L<sup>-1</sup> hygromycin을 첨가한 MS배지에 옮겨 배양하면서 hygromycin에 대하여 내성을 갖고 생존하고 있는 hairy root의 근단부에는 shikonin의 합성에

의한 것으로 보이는 적색 색소의 축적이 확인되었다.

또한 이 들 hairy root를 공시하여 PCR로 GUS gene의 삽입을 확인한 결과, hygromycin에 대한 내성이 있는 hairy root에서는 750 bp에서 GUS gene으로부터 유래되는 것으로 보이는 강한 band가 확인됨으로써 형질전환된 것으로 확인할 수가 있었다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

1. 저선량 방사선의 처리가 식물세포의 생장에 hormetin으로서 작용한다는 가능성을 확인할 수 있으므로 저선량 방사선의 생물산업의 생산성 증대에도 실용화를 확대시키는데 활용할 수 있다.

2. 저선량의 방사선 처리가 세포의 증대뿐만 아니라 세포내의 효소활성을 촉진시킴으로써 2차대사물의 생성에 촉매역활을 할 수 있음이 확인되어 식물세포공학분야에 유용하게 그 이용이 확대 될 수 있는 것이 확인되었다.

3. *Agrobacterium rhizogenes*을 이용하여 지치를 형질전환시켜 shikonin 생성이 가능한 hairy root를 발생시킴으로써 shikonin 생산에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

# SUMMARY

## I. Project Title

Development of Shikonin Productivity Enhancing Technique by Radiation Application

## II. Objective and Importance of the Project

To improve the low-dose radiation for stimulation of shikonin production from the callus culture and cell suspension culture and transformed hairy root culture of *Lithospermum erythrorhizon* by  $\gamma$ -ray irradiation.

## III. Scope and Contents of the Project

The stimulating effects of the low dose  $\gamma$ -ray irradiation on callus growth of *Lithospermum erythrorhizon*.

To investigate the responses and stimulating effects of the low doses  $\gamma$ -ray irradiation on shikonin production in cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon*.

To investigate of the activities of *p*-hydroxybenzoate geranyltransferase and *p*-hydroxybenzoate glucosyltransferase in

cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon* after irradiation of the low doses  $\gamma$ -radiation.

Selection of cell lines which increase shikonin production by the low dose  $\gamma$ -ray irradiation in cell suspension culture.

To induce hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834 for shikonin production.

#### IV. Results of the Project

The cell lines 679, 679-29 and 622-46 of *L. erythrorhizon* could be selected on LS agar medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for the production shikonin in cell suspension culture.

The accumulation of shikonin derivatives was increased moderately in suspension culture of cell line 622-46 of *L. erythrorhizon* in LS liquid medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark than other two cell lines. In comparison with the culture of callus on agar solid medium, cell growth was decreased in suspension culture.

The accumulation of shikonin derivatives was more increased in suspension culture of cell line 622-46 by adding  $1 \mu\text{M Cu}^{2+}$  and  $100 \mu\text{M}$  methyl jasmonate in M-9 medium.

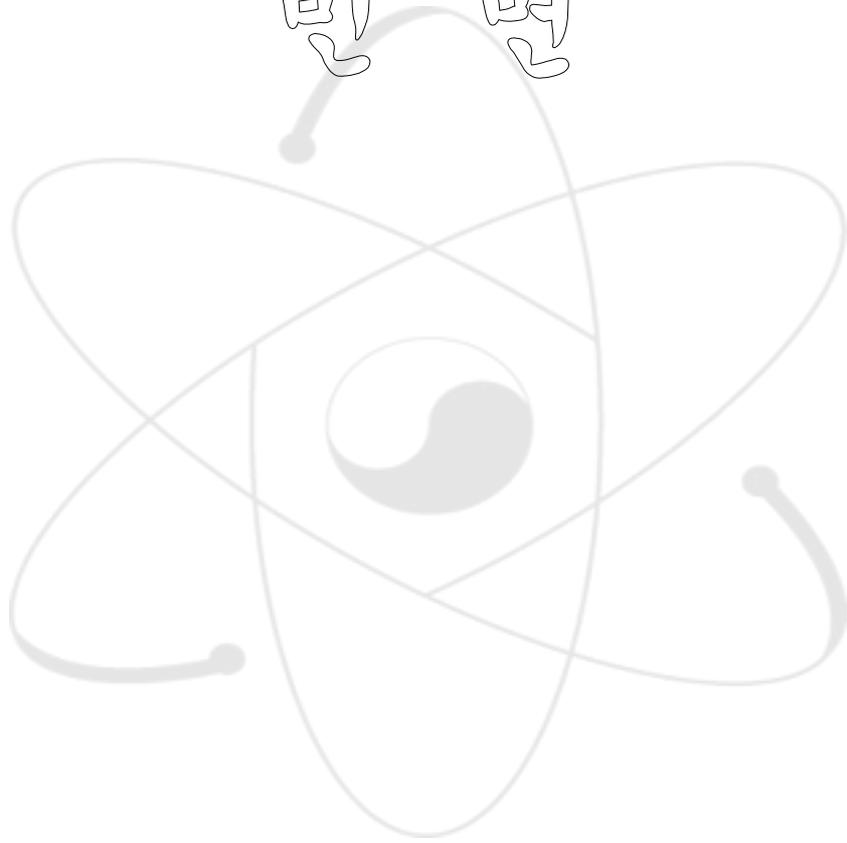
The effects of low doses of  $\gamma$  radiation on the production of shikonin derivatives was investigated in suspension culture with callus irradiated. The accumulation of shikonin in the liquid

medium was increased significantly by 2 Gy irradiation to callus of cell line 622-46 and culture in LS Liquid medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark. However the accumulation of shikonin in cell debris was higher by 16 Gy irradiation.

The activity of *p*-hydroxybenzoate geranyltransferase was increased by irradiation of 2 Gy and 16 Gy of  $\gamma$  radiation, but the activity of *p*-hydroxybenzoate glucosyltransferase was not regulated.

Seedling hypocotyles of *L. erythrorhizon* were infected with *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834 harboring a binary vector with an intron bearing the GUS ( $\beta$ -glucuronidase) gene driven by cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promotor as well as the HPT (hygromycin phosphotransferase) gene as the selection marker. Some hairy roots isolated were hygromycin resistant and had integrated GUS gene in their *L. erythrorhizon* genomic DNA. The root tip grown on M-9 medium showed normal pigment production pattern in border cells and root hairs.

비명



# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	1
Chapter 2. State of the art .....	5
Chapter 3. The contents and results of the research .....	8
Section 1. Selection of favorable cell line of <i>Lithospermum erythrorhizon</i> for massproduction of shikonin .....	17
Section 2. The production of shikonin by the low dose $\gamma$ -ray irradiation in cell suspension culture .....	24
Section 3. Gene transformation of <i>Lithospermum erythrorhizon</i> by <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	36
Chapter 4. Objectives of R&D and possible contribution .....	41
Chapter 5. Application .....	46
Chapter 6. References .....	47

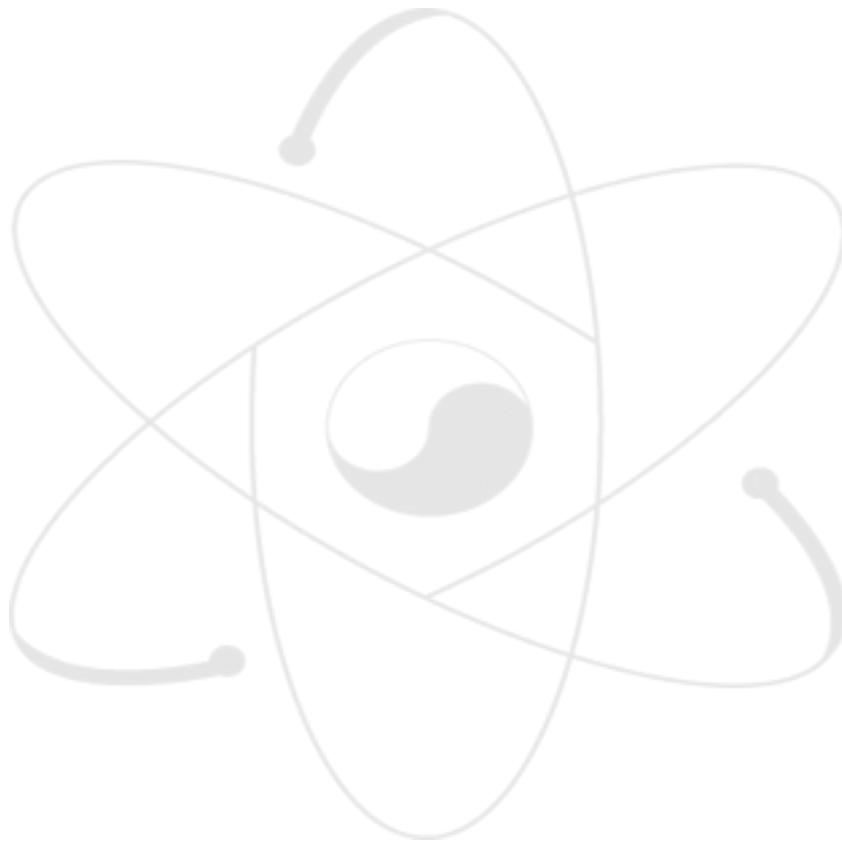
비명



# 목 차

제 1 장 서 론 .....	1
제 2 장 국·내외 기술개발 현황 .....	5
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	8
제 1 절 연구내용 및 방법 .....	8
1. Shikonin의 대량생산 우량 세포주의 지속적인 선발 .....	8
2. 저선량 방사선 조사에 의한 지치의 Cell Suspension Culture로 Shikonin 생산성 향상 검토 .....	12
3. 지치의 형질전환을 위한 <i>Agrobacterium rhizogeses</i> 의 gene transformation .....	15
제 2 절 연구결과 및 고찰 .....	17
1. Shikonin의 대량생산 우량 세포주의 지속적인 선발 .....	17
2. 저선량 방사선 조사에 의한 지치의 Cell Suspension Culture로 Shikonin 생산성 향상 검토 .....	24
3. 지치의 형질전환을 위한 <i>Agrobacterium rhizogeses</i> 의 gene transformation .....	36

제 4 장	연구개발 목표 달성도 및 대여 기여도 .....	41
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	46
제 6 장	참고문헌 .....	47

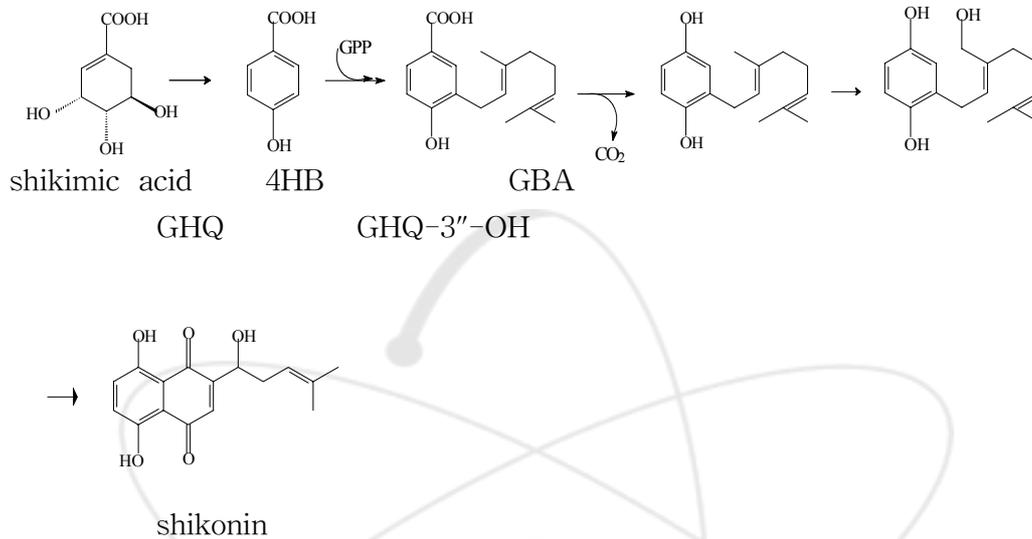


## 제 1 장 서 론

생물공학의 발전에 따라 그 기법을 산업에 효과적이고도 유용하게 이용하고자 하는 연구가 광범위하게 시도되고 있다. 식품의 첨가물이나 인체에 사용되고 있는 물질이나 색소의 경우에 있어서도 현재까지 주종을 이루어 왔던 유기합성물질의 이용이 건강이나 환경문제에 있어 합성물질의 유해성이 문제시되면서 천연물인 Bio-produces의 활용에 대한 관심도가 높아지고 또한 절실하게 요구되고 있다. 따라서 생체로부터 생성되는 천연물질이나 천연색소를 실용화 시키기 위해서는 생체의 조직이나 세포단위에서의 생성물의 합성 및 분비의 양을 보다 증가시키기 위한 기술의 개발이 확립되어야 할 필요가 있다.

지치(*Lithospermum erythrorhizon* S.)는 한국, 일본 및 중국에 주로 자생하는 식물로서 shikonin이라는 물질이 자근에 함유되어 있어 오래 전부터 생약 및 고급염료로 사용되어 왔다. 이 shikonin은 naphthajarin 골격을 가진 적자색의 화합물로서 자근중에는 저급지방산 ester의 형태로도 존재하고 있다. Shikonin의 약리작용을 보면 매우 강한 항균작용, 창상치료작용, 항괴양작용 등 그 효능이 광범위하게 인정되며 현재에도 외상약이나 치질의 치료약으로 널리 사용되고 있다. 또 이것의 약리작용 뿐만 아니라 그 선명한 색조를 이용해서 최근에는 천연색소의 Bio원료로 각종 화장품에도 사용되기도 한다.

지치 근부조직에서 합성되는 붉은 색소는 1,4-naphthoquinone인 shikonin이 주성분이라고 1922년 Tajima 와 Kuroda에 의해 밝혀진 이래 (Tabata 등, 1974) 이 물질에 대한 관심도가 높아져 shikonin과 그 계열 화합물인 deoxyshikonin, acetylshikonin, isobutylshikonin,  $\beta,\beta$ -dimethylacrylshikonin, isovalerylshikonin,  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin 등이 합성되고 있는 것이 밝혀졌다.



**Figure 1.** Biosynthetic pathways of shikonin from shikimic acid in higher plants. 4HB, 4-hydroxybenzoic acid; GBA, 3-geranyl-4-hydroxybenzoic acid; GHQ, geranylhydroquinone; GHQ-3''-OH, 3''-hydroxygeranylhydroquinone; GPP, geranylpyrophosphate.

그러나 이 물질들은 주로 노화된 근부조직의 코르크층에서만 국한적으로 합성되는 것으로 알려졌을 뿐 식물체에서의 합성조절에 관한 연구의 발표는 없었다. 결국 생체내에서의 shikonin 생산 증대에 대한 기대가 어려워지면서 Tabata등 (1974)은 최초로 지치조직의 callus배양을 시도하여 auxin의 종류와 광조건의 조절로 callus에서의 shikonin합성을 증가시키는데 성공함으로써 식물생체에서의 shikonin 합성의 조절은 어려우나 세포배양에서의 조절은 가능하다는 가능성을 시사하였다. 이는 생체에서도 shikonin의 합성은 뿌리부위의 표피조직에 해당되는 코르크

층에서만 합성되듯이 callus 조직에서도 내부세포보다 외부세포등에서 현저하게 다량으로 합성되므로 효과적인 계대배양 및 세포의 노화조절과 함께 auxin의 조절에 의해 합성량이 조절될 수 있음을 예측할 수 있다. Shikonin은 뿌리의 노화된 cork층에서만 국한적으로 합성되는 2차대사물질인 관계로 양적으로 매우 소량이어서 shikonin을 1.5% 함유한 지치의 뿌리를 생산하는데에는 무려 4년이라는 장기간의 시간이 요구된다. 따라서 이 물질들을 소재로 한 약제의 생산이나 색소의 본격적인 산업화의 이용면에서 경제성에 어려움이 많았다. 이러한 현상을 식물세포공학을 도입하여 세포의 대사활동에서 체내 효소의 활성화에 적합한 환경조건을 밝히고, 이 조건을 부여할 수 있다면 세포주의 현탁배양으로 약 800배의 shikonin을 공업적으로 대량생산할 수 있는 부가가치가 매우 높은 물질로 평가되고 있다.

지치의 세포내의 대사과정에서 shikonin생산을 높이는데는 외부의 배양조절로 세포내 효소의 활성화를 극대화시키는 것이 관건이 된다. 외부의 배양조건의 조절에는 배양온도나 일장과 같은 환경조건, 배지에 주어지는 물질의 변화에 따른 배지조건 등 몇 가지 요인을 검토할 수 있는데 그 요인 중에 한 방법으로 저선량 방사선조사에 의한 자극효과를 들 수 있다.

모든 생명은 강한 방사선, 특히 높은 선량 존재하에서 진화하여 왔으며 일상생활 중 저수준의 방사선을 계속 방출하고 있어 사람을 포함한 모든 생체는 전리방사선을 피할 수 없다. 그러나 방사선 장애에 관한 지식 특히 저선량율과 저·중선량 피폭에 대한 정보가 부족하여 고선량 급성 피폭에 관한 정보에 근거하기 때문에 저수준의 방사선 작용을 잘못 해석하기가 쉽다.

Southam과 Ehrlich(1943)는 참나무 수피추출물의 고농도에선 균류의 생장이 억제되나 저농도에선 생육을 촉진한다는 것을 처음으로 발견하여 고선량에선 유해하고 치명적이나 저선량에선 자극이 있음을 설명하는 새로운 용어인 hormesis를 최초로 사용하였으며, Luckey(1978)는 생육

감소를 기대하며 가축에 항생물질을 주었는데 일정수준의 저농도 항생물질이 생육을 최고조로 촉진하였음을 관찰하고, Luckey(1980)는 여러 문헌조사에서 hormesis가 특히 저선량 이온화 방사선에서 보편적으로 일어나는 결과인 것을 알았다. 일반적으로 hormesis는 유해작용을 가진 물질이 유해량 이하에서는 다량의 동일 작용물질이 나타내는 장해 영향과는 정반대의 영향을 보여주는 것이다. 일반적으로 hormesis는 방사선과 같은 유해작용을 가진 물질이 유해량 이하에서는 고농도의 동일물질이 나타내는 장해작용과는 정반대의 영향을 보여주는 현상으로 Simon 과 Bhattacharya(1977), Luckey (1980)는 바로 저선량의 방사선이 식물에 대해서는 생육에 자극작용을 준다고 인정하였다.

이상에서 알 수 있는 바와 같이, 지치는 우리나라에 자생하고 있지만 현재에는 생산량 감소상태에 있으며, 많은 양을 외국으로부터 수입에 의존하고 있는 실정이고, 원료공급의 불안정이 문제가 되고 있다. 따라서 shikonin의 효율적인 원료의 대량 공급을 위하여 앞에서의 방사선의 효과를, 식물체의 외형적인 생육에만 결부시키지 않고 세포내의 효소의 활성을 촉진시켜 지치에서 합성되는 2차대사물의 합성을 촉진시킬수 있는가에도 연관지어 연구해 볼 가치가 있어 저선량 방사선 처리에 의한 callus의 생산이나 색소의 생산을 증대하기 위한 배지 및 배양조건에 대한 연구할 필요성이 인정되어 본 실험을 수행하였다.

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

상처, 화상, 및 치질에 쓰여져 오던 지치(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb.)에서 합성되는 붉은 색소는 1,4-naphthoquinone인 shikonin이 주성분이라고 1922년 Tajima와 Kuroda에 의해 밝혀진 이래 (Tabata 등, 1974) 이 물질에 대한 관심도가 높아져 shikonin의 유사물질 까지 밝혀졌다. 그러나 이 물질들의 합성의 지치의 근부조직의 cork층에서만 국한적으로 합성되는 것으로 알려졌을 뿐 식물체에서의 합성조절에 관한 연구의 발표는 없었다. 결국 생체내에서의 shikonin 생산증대에 대한 기대가 어려워지면서 Tabata등(1974)은 최초로 지치조직의 callus 배양을 시도하여 auxin의 종류와 광조건의 조절로 callus에서의 shikonin 합성을 증가시키는데 성공함으로써 식물생체에서의 shikonin 합성의 조절은 어려우나 세포배양에서의 조절은 가능하다는 가능성을 시사하였다. 이는 생체에서도 shikonin의 합성은 뿌리부위의 표피조직에 해당되는 cork층에서만 합성되듯이 callus조직에서도 내부세포에서보다 외부세포층에서 현저하게 다량으로 합성되므로 효과적인 계대배양 및 세포의 노화조절과 함께 auxin의 조절에 의해 합성량이 조절될 수 있음을 예측할 수 있다.

붉은 색소인 naphthoquinone shikonin은 4-hydroxybenzoic acid와 geranyl diphosphate의 결합이 3-geranyl-4-hydroxybenzoate와 geranylhydroquinone(GHQ)을 통하여 합성되는 것으로 확인되었고(Heide et al. et al. 1989; Löscher and Heide 1994; Sommer et al. 1995), 이 때 shikonin 합성 조절 효소인 4HB geranyltransferase도 최근 지치의 세포배양에서 정제되었다(Gaissner and Heide 1996; Mühlenweg et al. 1998). 그러나 지치세포의 증식에 적합한 LS배지(Linsmair and Skoog 1965)에서는 어떠한 naphthoquinone도 합성되지 않고 쓸모없는 GHQ 유도

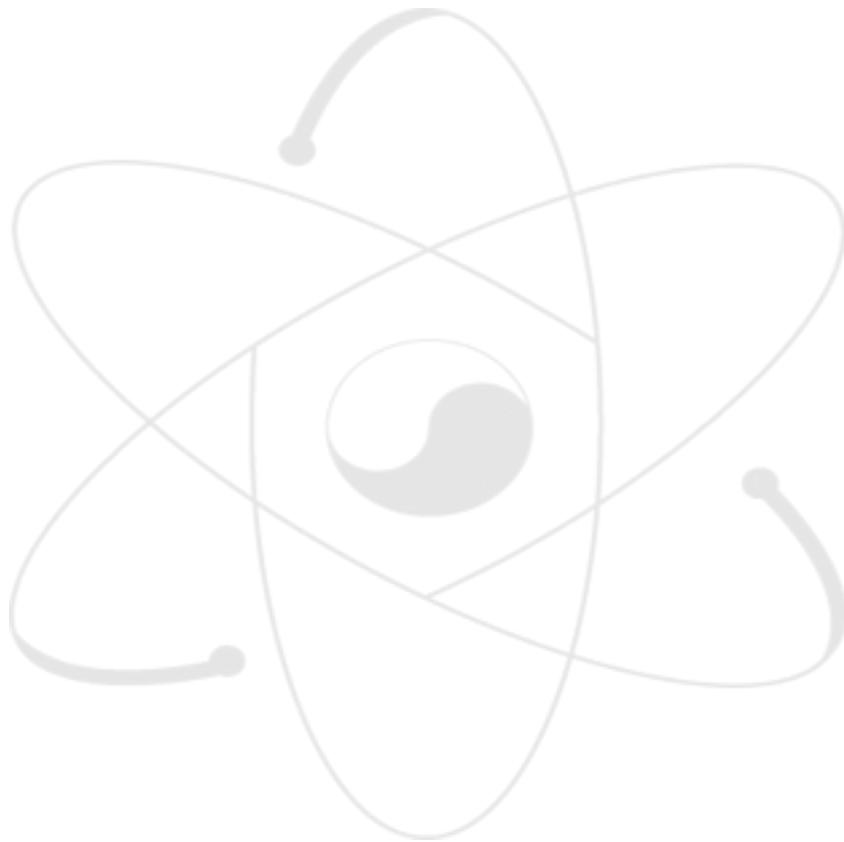
quinone인 dihydroechinofran만 다량으로 배지에 축적되는 것으로 확인되었다(Fukui et al. 1992). Geranylhydroquinone(GHQ)으로부터 dihydroechinofran과 shikonin으로 전환되는 기작에 대해서는 아직 분명하지 않지만 cytochrome P-450도 크게 작용하는 것이라는 보고도 있다(Yamamoto et al. 2000)

지치의 세포배양에 있어서 shikonin의 생산은 배양조건에 따라서 많은 차이가 있어, Fujita 등(1981)의 결과보고에 의하면 배지의 조성에 따라서도 shikonin의 생산에 큰 차이가 있으며, 또한 세포의 성장세와 shikonin의 합성과는 비례적이 아님을 보이고 있다. 즉 배지의 조성에서 질소원의 종류와 농도에 따라 shikonin의 생산량에 큰 영향을 주어  $\text{NH}_4\text{-N}$ 는 어느 정도의 양까지 세포의 성장을 촉진하지만 shikonin의 합성에는 고도의 억제적 역할을 하고,  $\text{NO}_3\text{-N}$ 가 shikonin합성을 촉진하는 것으로 나타났다. 세포내에서의 shikonin합성에 영향을 주는 요인은 배지의 질소원 뿐만 아니라 당원에서도 차이가 있고, ascorbic acid는 shikonin이나 그 유사물질의 합성을 촉진하며, 고농도의  $\text{Ca}^{2+}$ 나  $\text{Fe}^{2+}$ 는 억제한다는 보고도 있다(Mizukami 등, 1986).

아울러 세포로부터 shikonin의 합성은 광의 영향을 많이 받아 광조건하에서는 shikonin의 합성이 억제되고, 암조건하에서는 shikonin의 합성이 증대되는 결과가 나왔으며, 이의 원인은 세포내의 효소의 영향으로서 광조건하에서는 shikonin합성의 중간과정에서 *p*-hydroxybenzoic acid가 *p*-hydroxybenzoic acid-*O*-glucoside로 전환되어 shikonin으로의 대사과정이 중단되지만, 암조건하에서는 *p*-hydroxybenzoic acid가 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid로 전환되어 shikonin을 합성하기 때문으로 확인되었다(Heide 등, 1989).

이와 같은 결과들을 검토해 볼 때 phenylalanine으로부터 shikonin으로 가는 대사과정은 내부의 효소의 영향이 크지만, 세포내의 효소활성과

연관지는 배양의 환경조건에 대한 종합적인 연구검토는 이루어지고 있지 않다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구내용 및 방법

#### 1. Shikonin의 대량생산 우량 세포주의 지속적인 선발

##### 1) 공시재료

충남 금산에서 구입한 지치(*Lithospermum erythrorhizon*)뿌리를 수세한 후 70% ethyl alcohol로 소독한 다음 25% sodium hypochlorite(Cl농도 10%)용액에 20분간 침지소독하였다. 소독이 끝난 후 멸균증류수로 3회 세척한 뿌리로 부터 유관속 부위의 조직절편을 채취하여 공시재료로 사용하였다. 조직절편은 NAA가 5mg/L 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962)기본배지에 치상하여 25℃, 16시간 장일조건과 광도는 20,000lux하에서 배양하여 얻어진 캘러스를 공시재료로 사용하였다.

##### 2) Callus의 배양을 위한 배지 및 배양조건

세포주의 유지를 위한 기본배지는 LS배지를 사용하였고, 액체배양을 위한 기본배지로는 LS배지와 M-9배지의 두 종류를 사용하였다. 어느 경우에도 성장조절물질로는 황 등(2000)의 보고에 의한 BA 2 mg · L<sup>-1</sup>와 IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>를 첨가하였고, sucrose의 농도는 3%로 하였다. pH는 살균 전에 5.8로 하고, 121℃로 15분간 고압멸균 하였다. IAA와 methyl jasmonate와 같은 특정 시약은 membrane filter(0.45 μm)로 제공하였다.

액체배양의 경우 그림 1과 같은 5리터의 배양기와 그림 2와 같은 7리터의 bioreactor를 이용하여 암조건으로 실온에서 배양하였다.



Figure 2. Bioreactor(left, 5 L; right, 7 L vessel) for cell suspension culture of *L. erythrorhizon*.

### 3) 세포주의 선발

Callus를 지속적으로 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 LS(Linsmeir and Skoog, 1965) 고체배지상에서  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 암조건에서 3주간격으로 지속적인 계대배양을 하면서 LS액체배양에서의 shikonin 합성이 양호한 세포주를 선발하였다.

이와 같이 하여 선발된 세포주 들 중 고체배지상에서 shikonin 합성이 가장 양호한 것으로 판단된 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 공시하여 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 LS액체배지에서 2주간 배양한 후 shikonin 합성량을 측정하였다.

### 4) $\text{Cu}^{2+}$ 및 methyl jasmonate의 효과

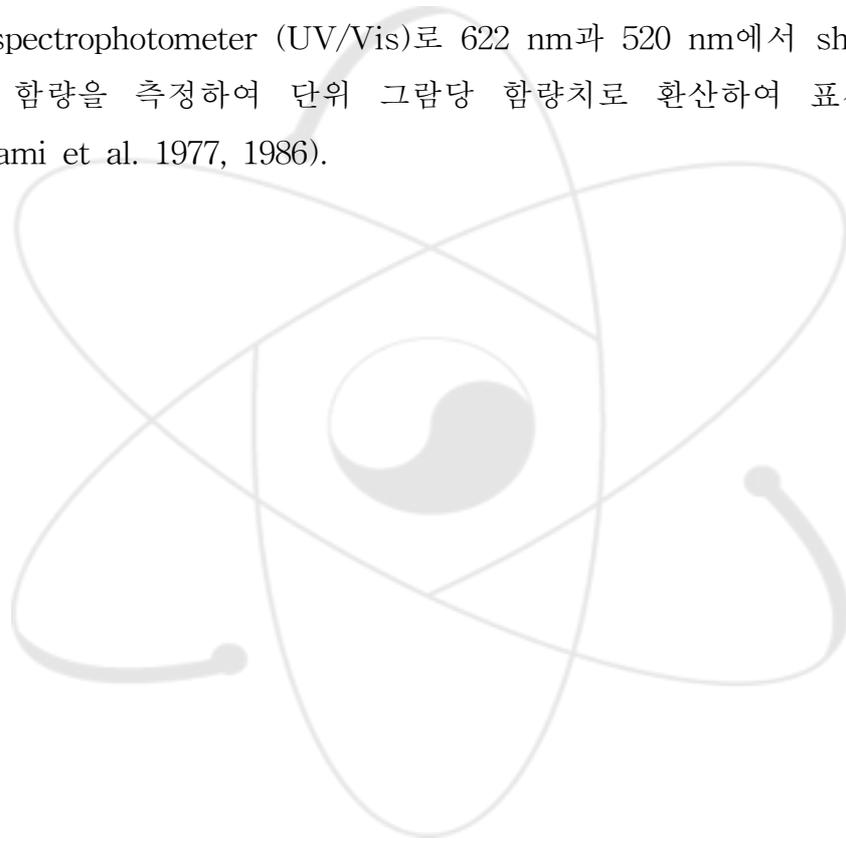
선발된 세포주 들 중 shikonin 합성이 가장 양호한 것으로 판단된 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 공시하여 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 M-9액체배지에  $0.1$  및  $1 \mu\text{M}$ 의  $\text{CuSO}_4$ 를 첨가하여 reciprocal shaker로 100rpm의 진탕으로 2주간 배양한 후 shikonin 합성의 능력을 조사하였으며, 한편으로 jasmonate의 효과를 검토하기 위해  $100 \mu\text{M}$ 의 methyl jasmonate도 동시에 처리하였다.

Methyl jasmonate는 Yazaki(1995) 등의 방법에 의해 DMSO에 용해시킨 후 배양종료 18시간 전에 배지에 최종 농도가  $100 \mu\text{M}$ 이 되도록 첨가하였다.

### 5) Shikonin의 함량 조사

소정 기간동안 배양한 후 여지(Watman No.2)로 여과하여 배지용액과 callus로 분리하였다. 배양액은 150 mL의 chloroform으로 암상태( $4^\circ\text{C}$ )에서 24시간 추출한 후 분획하여 chloroform층을 회수하였다. Callus는 Mizukami 등(1977)의 방법에 의해 소량의 chloroform을 첨가한 상태로

mortar에서 잘 마쇄한 후 30mL의 chloroform용액으로 암상태(4℃)에서 24시간 추출한 다음, 여과지(Watman No.2)로 여과하였다. 회수된 chloroform용액에 1-2 g의  $MgSO_4$ 를 첨가하여 탈수시킨 다음 evaporator를 이용하여 40℃에서 5 mL로 진공농축시켰다. 5 mL의 농축액으로부터 0.05 mL를 채취하여 약 30분간 진공건조시킨 다음, 채취한 농축액에 2.5% KOH 1 mL를 첨가하고 약 15분간 강하게 흔들어서 용해시킨 후 spectrophotometer (UV/Vis)로 622 nm과 520 nm에서 shikonin 유도체의 함량을 측정하여 단위 그램당 함량치로 환산하여 표시하였다 (Mizukami et al. 1977, 1986).



## 2. 저선량 방사선 조사에 의한 지치의 Cell Suspension Culture로 Shikonin 생산성 향상 검토

### 1) 방사선 조사

저선량 방사선 조사에 사용한 조사시설은 한국원자력연구소에서 보유 중인 저준위조사시설 ( $^{60}\text{Co}$ , 선원강도 150 TBq)을 이용하여  $\gamma$ 선을 0.0, 2.0, 16.0, 30.0 Gy의 4수준으로 callus에 직접 조사하였다. 조사선량을 Fricke dosimeter로 측정하였다 (Niels and Roger, 1970). 방사선 조사조건은 표 1에서 보여주는 바와 같다.

Table 1. Irradiation condition of  $\gamma$ - radiation used in the experiment

Treatment No.	Dose (Gy)	Dose rate (Gy/h)	Irradiation time (h)
1	0.0	0.00	0
2	2.0	2.01	1
3	16.0	2.67	6
4	30.0	5.00	6

## 2) 저선량 방사선 조사에 의한 지치의 Bioreactor Culture System에 의한 Shikonin 생산증가 효과

1차적으로 선발된 지치세포주 중 shikonin생성이 가장 양호한 것으로 판단된 622-46의 callus를 주종세포주로 결정하여 3주간 계대배양한 후에 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 10 g의 크기로 500 ml의 LS액체배지에 넣어 3주간 현탁배양한 후 배지 용액과 배양 세포주를 분리한 상태로 shikonin을 추출하여 622 nm과 520 nm에서 측정하였고, 연속해서  $\gamma$ 선을 0.0, 2.0, 16.0, 30.0 Gy의 4수준으로 확대하여 조사한 후 각각 10 g의 callus를 배양기로 2주간 배양하여 622 nm의 spectrophotometer로 shikonin의 합성효과를 측정하였다.

## 3) 저선량 방사선 조사에 의한 체내효소 활성증대효과

### (1) Cell free extract의 준비

선발된 세포주 622-46의 callus를 주종세포주로 3주간 계대배양한 후에 2Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 10 g의 크기로 500 ml의 LS액체배지가 담긴 5 L의 배양기에 넣어 2주간 배양을 하였다.

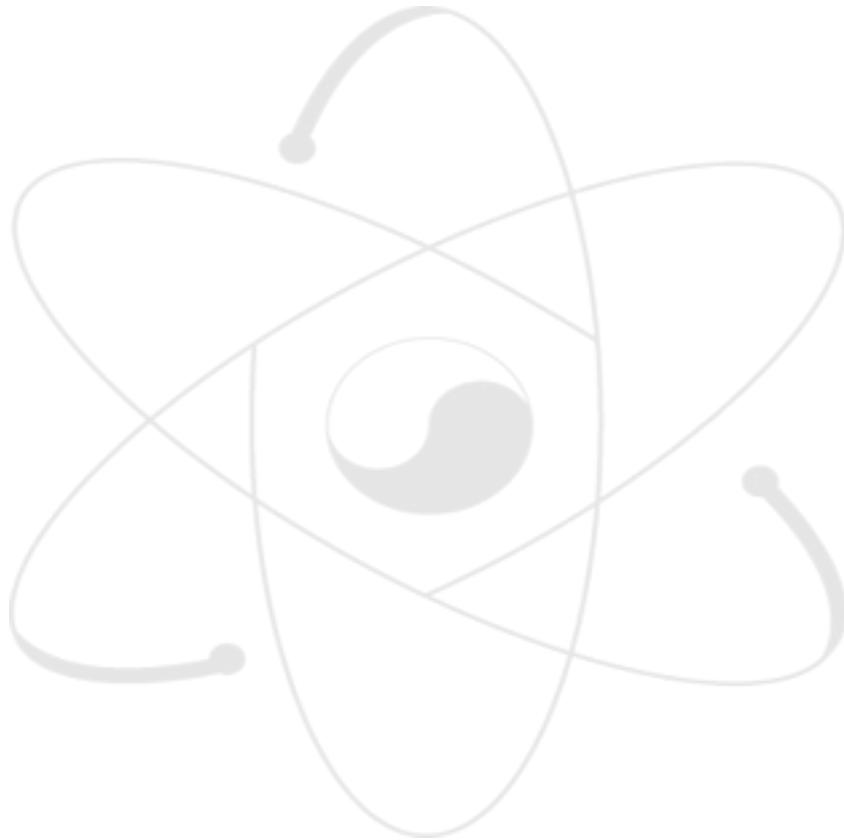
배양 종료 후 2.0 g의 세포를 채취한 후 K-Pi 완충액(0.1 M, pH 6.5), 0.01 M DTT 및 5%(w/w) PVPP(polyvinylpolypyrrolidone)를 첨가한 상태에서 유발로 매쇄하였다. 매쇄한 세포를 10,000 g에서 10분간 원심분리한 후 침전물은 제거하고 상정액을 채취하여 sephadex 25(Pharmacia PD 10 column; sephadex G-25M, bed vol. 9.1 mL, column length 5 cm, column diam. 1.6 cm)에 통과시키고, Tris-buffer(0.05 M Tris-HCl, pH 7.8)로 elution하였다.

(2) PHB-glucosyltransferase의 활성을 측정하기 위하여 2.5  $\mu$ M의 PHB, 20  $\mu$ M의 UDP- glucose 및 80  $\mu$ L의 cell-free extract 혼합액 100  $\mu$

L를 작성하였다.

(3)  $\beta$ -glucosidase의 활성을 측정하기 위해서는 90  $\mu$ L의 cell-free extract와 2.5  $\mu$ M DHBOG의 혼합액 100  $\mu$ L를 작성하였다.

이상의 두 가지 혼합액을 30°C에서 90분간 보관한 후 20% TCA를 첨가한 후 반응시켰다. 반응 후 혼합액들은 원심분리하여 단백질을 제거하고 상정액을 채취하여 HPLC로 각각의 효소를 측정하였다.



### 3. 지치의 형질전환을 위한 *Agrobacterium rhizogenes*의 gene transformation

#### 1) Vector Construction

Intron을 가지고 있는 GUS( $\beta$ -glucuronidase) gene을 Yazaki 등 (1998)의 방법에 따라 binary vector pBin19에 subclone하였다. 아울러 형질전환된 hairy root를 선발하기 위해 hygromycin phosphotransferase gene도 동시에 T-DNA 영역안에 삽입하였다.

#### 2) 지치 seedling에의 *A.rhizogenes* infection

지치의 종자를 15% sodium hypochloride로 20분간 표면소독한 후 멸균증류수로 3회에 걸쳐 세척한 다음 MS배지에 무균적으로 파종하여 25°C에 암조건으로 발아시켰다. 하배축이 2-4cm 정도 신장하였을 때 절단, 채취하여 재료로 사용하였다.

Binary vector를 포함한 *A.rhizogenes* strain 15834를 YEP 고체배지에 접종하여 28°C에서 하룻 밤 배양한 후 single colony를 채취하여 50 mL의 YEP 액체배지에 접종한 후 28°C로 orbital shaker (180 rpm)에서 하룻밤 동안 배양하였다.

예리한 mess로 절단 하여 채취한 지치의 하배축에 균주를 침지 접종한 후 0.8% agar를 함유한 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고체배지에 치상한 후 25°C에 광조건으로 배양하였다. *A.rhizogenes*와 2일간 공조배양한 후, 멸균 증류수로 외식체로 부터 bacteria를 세척해 낸 다음 3% sucrose, 0.8% agar 및 250 mg · L<sup>-1</sup> cefotaxime이 첨가된 MS고체배지에

다시 치상하여 25℃에서 배양하였다.

1개월 정도의 배양에서 hairy root가 발생한 후에 25 mg · L<sup>-1</sup> hygromycin을 첨가한 MS배지에 옮겨 배양하면서 형질전환된 개체를 선발하였고, Fujita 등(1998)의 방법에 의한 PCR로 GUS gene의 삽입을 확인하였다.



## 제 2 절 연구결과 및 고찰

### 1. Shikonin의 대량생산 우량 세포주의 지속적인 선발

Callus를 지속적으로 BA 2 mg · L<sup>-1</sup>와 IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>를 첨가한 LS(Linsmeir and Skoog, 1965) 고체배지상에서 25±2℃의 암조건에서 3주간격으로 지속적인 계대배양을 하면서 shikonin합성이 양호할 것으로 예측되는 세포주를 선별해 나간 결과 몇 가지의 세포주를 선발하여 기본 line으로 유지하였다.

이와 같이 하여 선발된 세포주 들 중 고체배지상에서 shikonin 합성이 비교적 양호한 것으로 판단된 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 공시하였다. 이들 세포주들은 BA 2 mg · L<sup>-1</sup>와 IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>를 첨가한 LS고체배지에서 암배양할 때 callus의 증식이 완성하였을 뿐 아니라 callus에서의 shikonin 분비도 비교적 양호하였다(Fig. 3).

이 들 각 세포주 10 g의 callus를 BA 2 mg · L<sup>-1</sup>와 IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>를 첨가한 LS액체배지에서 암조건으로 3주간 배양한 후 세포의 증식과 shikonin 합성량을 측정한 결과, Fig. 4에서와 같이 생체중의 증가는 622-46 line에서 가장 양호하였고 다음 679가 양호하였으며 679-29 line이 가장 저조하였다. 그러나 622-46 line의 경우에서도 고체배지에서의 생육보다는 세포의 생체중 증가속도는 훨씬 저조한 편이었다. Shikonin의 생성에 있어서도 다른 두 line에 비해 622-46 line에서 월등하게 높았으며 679 line이 생체중의 증가에서 679-29 line에 비해 양호하였지만 shikonin의 생성에서는 반대로 679-29 line이 다서 양호하였던 것으로 나타났다.

이 결과로 볼 때 일반적으로 지치의 세포배양에서 shikonin을 생산할 경우에는 세포주의 증식단계에 이용하는 배지 및 환경조건과 shikonin

합성에 도입하는 배지 및 환경조건이 각각 다른 2단계 배양법을 사용하고 있지만 세포주의 선발에 따라 세포 증식배지인 LS배지에서도 shikonin 생성의 유도가 가능한 것으로 확인되었다.



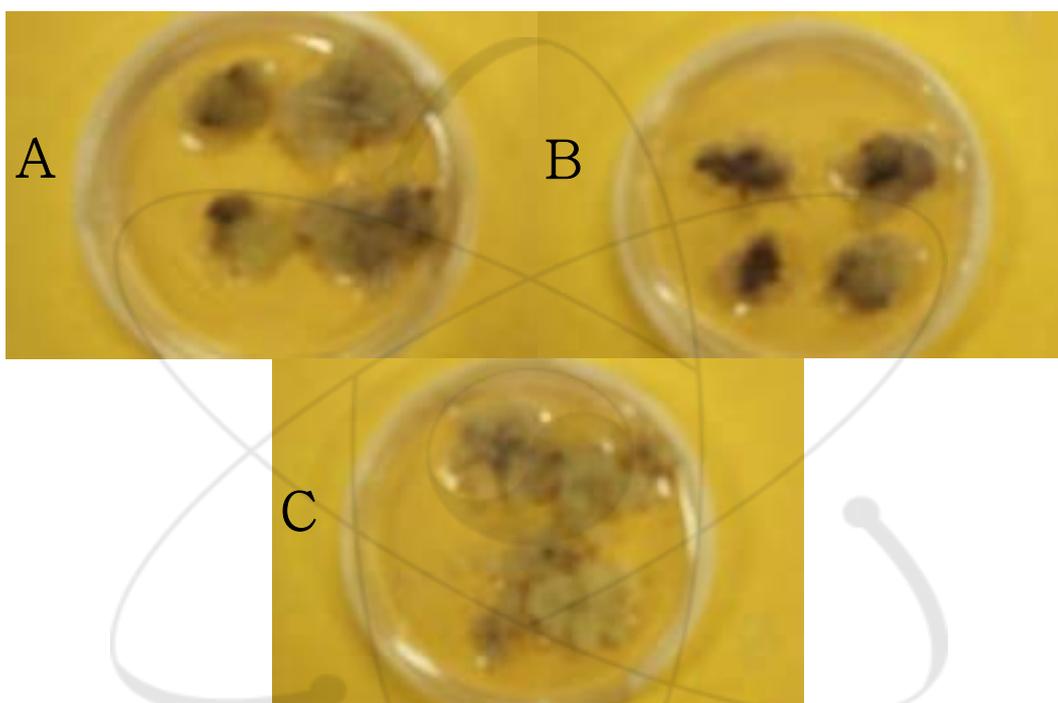


Figure 3. Calli of cell lines selected by subcultures for shikonin production in cell suspension culture after irradiation of  $\gamma$ -ray. A, cell line 679; B, cell line 679-29; and C, 622-46.

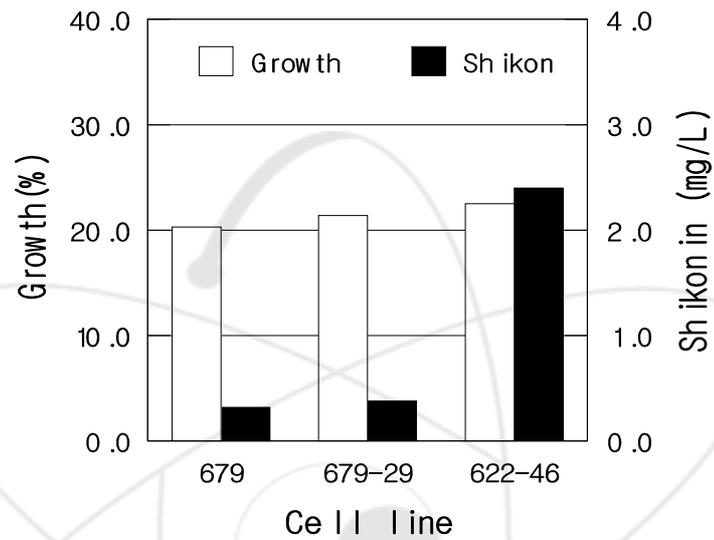


Figure 4. Increasing rate of growth and the contents of shikonin from callus culture of 3 cell line of *L. erythrorhizon* for 14 days on the LS medium supplemented with BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

선발된 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 공시하여 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 M-9액체배지에 0.1 및  $1 \text{ } \mu\text{M}$ 의  $\text{CuSO}_4$ 를 첨가하여 shikonin합성의 능력을 조사하고, 아울러 jasmonate의 효과를 검토하기 위해 0, 100  $\mu\text{M}$ 의 methyl jasmonate도 동시에 처리하여 reciprocal shaker로 100 rpm의 진탕으로 2주간 배양한 후의 결과는 Fig. 5에서와 같이 M-9배지에서도 622-46 line의 세포주에서 다른 line에 비해 shikonin의 합성이 현저하게 양호하였다.

$\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에 있어서는  $1.0 \text{ } \mu\text{M}$ 의 처리에서 42%의 증가효과를 얻을 수가 있었는데, 이는 Fig. 6에서 *p*-hydroxybenzoic acid가 다음 단계로 넘어가는 대사과정에서 *p*-hydroxybenzoic glucoside로 넘어가지 않고 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic로 넘어가는 과정(Fig. 6, ②)을  $\text{Cu}^{2+}$ 가 촉진하는 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(Heide *et al.* 1989, Fujita *et al.* 1981). 그러나  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에 있어서도  $0.1 \text{ } \mu\text{M}$ 과 같은 저농도에서는 효과가 거의 없는 것으로 파악되었다.

Shikonin의 생합성에서의 methyl jasmonate의 효과에 있어서도  $100 \text{ } \mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 경우 무처리레 비해 약 2배에 가까운 증가를 보였으며 특히  $0.1 \text{ } \mu\text{M}$ 의  $\text{Cu}^{2+}$ 와 동시에 처리하였을 때에는 단독처리에 비해 다시 2배에 가까운 증가율을 보이고 있다. 이는 methyl jasmonate도  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에서와 같이 *p*-hydroxybenzoic acid가 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid로 넘어가는 과정을 촉진하는 것으로 알려져 있고 (Gaisser and Heide, 1996), Mühlenweg 등(1998)은 methyl jasmonate  $100 \text{ } \mu\text{M}$ 를 처리함으로써 *p*-hydroxybenzoic acid가 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid로 넘어가는 과정을 유도하는 *p*-hydroxybenzoic geranyltransferase의 활성이 200배나 증가하였다고 보고하였다.

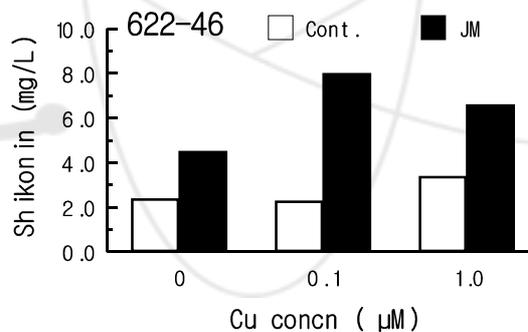
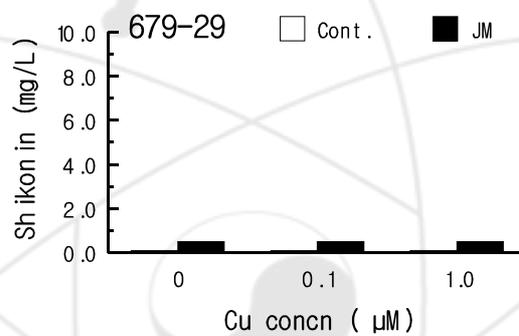
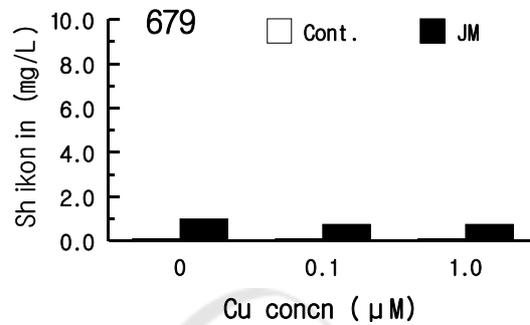


Figure 5. Shikonin contents in cell suspension culture for 2 weeks with selected cell line 679, 679-29, and 622-46 of *L. erythrorhizon* in modified M-9 liquid medium containing 0, 0.1, 1.0 µM CuSO<sub>4</sub> and 0 (Cont.), 100 µM methyl jasmonate (JA) dissolved in DMSO 18 hours before harvest.

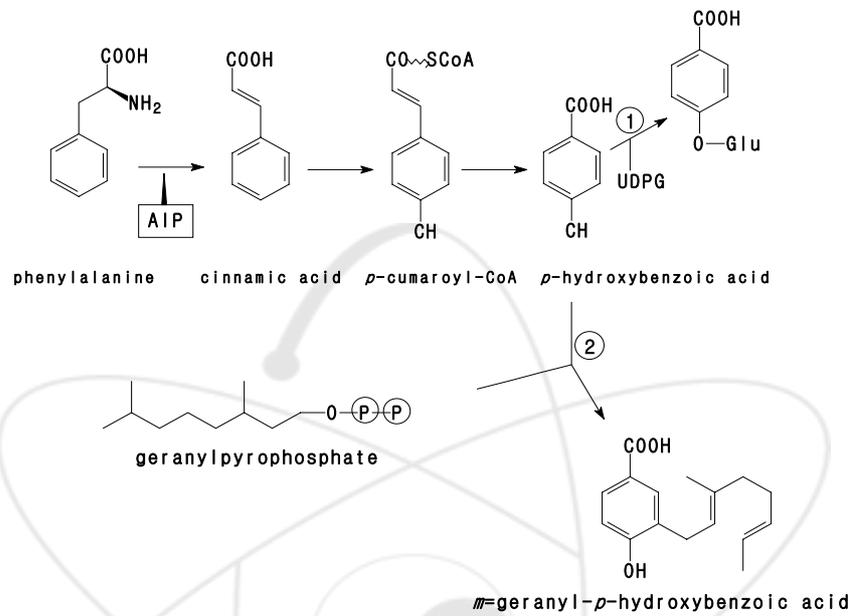


Figure 6. Biosynthetic pathway of the PHB-glucoside and *m*-geranylhydroxybenzoic acid. ①, PHB glucosyltransferase; ②, PHB geranyltransferase.

## 2. 저선량 방사선 조사에 의한 지치의 Bioreactor Culture System에 의한 Shikonin 생산증가 효과

1차적으로 선발된 지치세포주 중 shikonin생성이 가장 양호한 것으로 판단된 622-46의 callus를 주종세포주로 결정하여 3주간 계대배양한 후 0, 2, 16 및 30 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 10 g의 크기로 500 ml의 LS 액체배지에 넣어 3 L의 bioreactor에서 14일간 암조건으로 현탁배양한 결과 배양배지와 배양세포로부터 매우 선명하고 깨끗한 색소물을 추출할 수가 있었다(Fig 7, 8).

상기의 배양결과 배양배지에서의 shikonin의 합성량은 Fig. 9에서와 같이 2 Gy 조사구에서  $21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 다른 조사구에 비해 월등하게 높게 나타났고, 다음으로 16 Gy 조사구가 높았으며, 30 Gy 조사구에서는 대조구와 차이를 보이지 않았다.

반면에 배양세포로부터 추출한 경우에는 배지용액의 경우와 다르게 16 Gy 조사구에서  $63.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 shikonin의 합성 및 축적이 현저하게 높았음을 보여주었고 다음이 30 Gy 조사구로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때, 연구에서 shikonin 생산에 매우 유효성이 높은 세포주 622-46이 선발되었으며, 이 세포주를 사용할 경우 세포증식으로만 사용되는 LS배지에서도 shikonin의 생산에 있어 세포증식용 배지와 shikonin합성용 배지를 구분하여 세포를 배양하는 2원 배양법에서 탈피하여 동일배지에서의 연속배양이 가능할 수 있을 것으로 간주된다.

Shikonin 생산을 목적으로 하는 지치의 현탁배양에 있어, 저선량  $\gamma$ 선의 조사 효과가 인정되었으며, 그 선량의 세기는 배지로의 용출에 있어서는 2 Gy가 가장 효과적이었으며, 세포주 내의 함유량에 있어서는 16 Gy 조사구가 현저하였다. 따라서 세포내의 shikonin의 양을 배지내로 용출시킬 수 있는 방법을 모색할 경우 16 Gy의  $\gamma$ 선을 조사함으로써 지

치의 세포 현탁배양으로 shikonin의 생산 효율을 현저하게 증대시킬 수 있을 것으로 확인되었다.





Figure 7. Red pigment of shikonin extracted from LS liquid medium cultured for 14 days with callus of cell line 622-46 irradiated with 0 (upper, left), 2 (upper, right), 16 (lower, left) and 30 Gy (lower, right) of  $\gamma$  radiation.



Figure 8. Red pigment of shikonin extracted from callus cultured for 14 days with callus of cell line 622-46 irradiated with 16 (left) and 30 Gy (right) of  $\gamma$  radiation

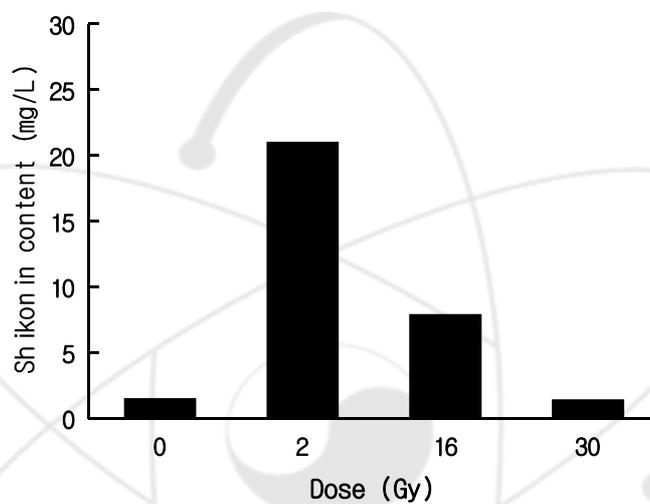


Figure 9. At 622 nm shikonin contents in the suspension culture medium of cell line 622-46 irradiated with  $\gamma$  radiation of 0, 2, 16, 30 Gy and cultured in LS medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark for 14 days.

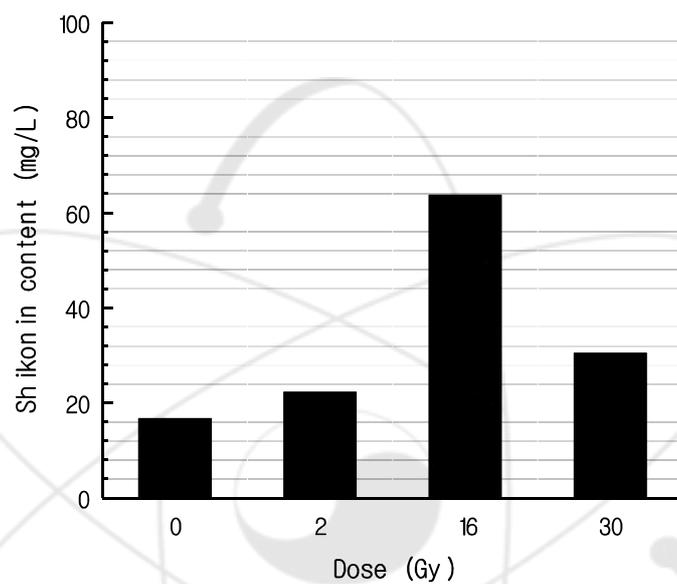


Figure 10. At 622 nm shikonin contents in the callus of cell line 622-46 irradiated with  $\gamma$  radiation of 0, 2, 16, 30 Gy and cultured in LS medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark for 14 days.

상기의 결과에 따라 재실험으로 선발된 지치세포주 622-46의 callus에 shikonin 합성에 효과가 가장 양호하였던 2 Gy의  $\gamma$ 선을 단독으로 조사한 후 2주일간 10 g의 재료를 3 L의 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 LS 액체배지에 넣어 7 L의 bioreactor로 14일간 배양한 결과는 Fig. 11에서와 같이 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 처리구와 무처리구 간에 색도에 있어 뚜렷한 차이를 보이고 있었다.

현탁배양한 후 배지 용액과 배양 세포주를 분리하여 shikonin을 추출하여 622 nm에서 측정된 결과, Fig. 12에서와 같이 배지 내 용출된 shikonin의 양은  $1.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이었는데 비해 2Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 배양한 배지 내에서의 양은  $21.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 으로 현저한 차이를 보였으며, 배양 세포들로부터 추출한 shikonin의 양도 대조구의  $16.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에 비해 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 배양한 세포에서 추출한 shikonin의 양은  $21.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 으로 높은 수치를 보이고 있다.

520nm에서의 측정결과에서도 배지내에 용출된 shikonin의 양은 Fig. 13에서와 같이 대조구에 비해 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 배양한 배지에서의 양이 현저하게 증가하여 shikonin의 생산을 위한 지치의 Callus 배양에서  $\gamma$ 선 조사의 효과가 인정되었으며, 더욱이 shikonin의 생산이 불가능하다고 알려졌던 세포 증식용 배지인 LS에서도 shikonin의 생산이 가능한 것으로 확인되었다.



Figure 11. Shikonin contents of cell line 622-46 irradiated with  $\gamma$  radiation 2 Gy(A) and 0 Gy(B) and cultured in LS medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark for 14 days.

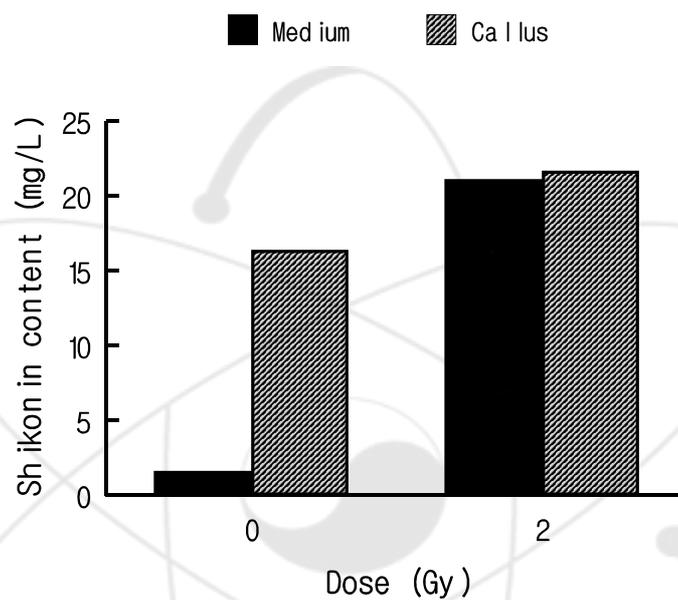


Figure 12. At 622 nm shikonin contents in the medium and callus of cell line 622-46 irradiated with  $\gamma$  radiation and cultured in LS medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark for 14 days.

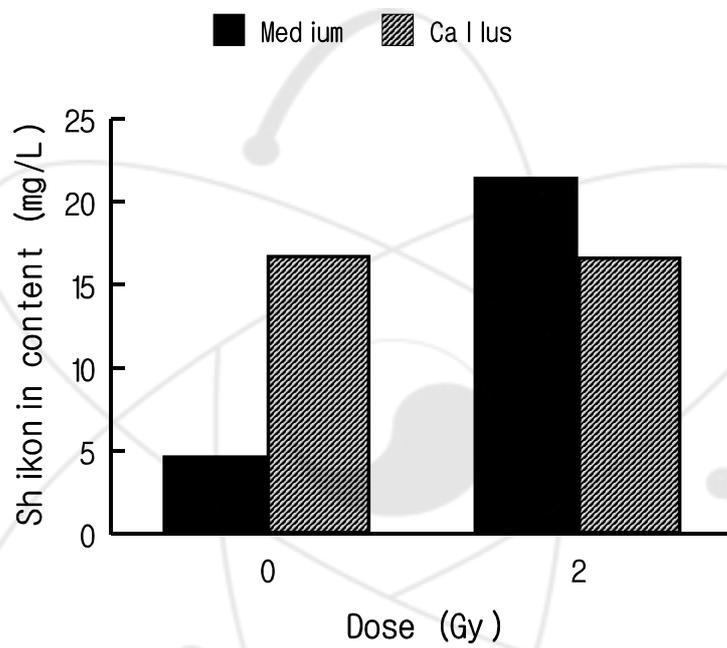


Figure 13. At 520 nm shikonin contents in the medium and callus of cell line 622-46 irradiated with  $\gamma$  radiation and cultured in LS medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark for 14 days.

선발된 세포주 622-46의 callus를 주종세포주로 3주간 계대배양한 후에 2Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 10 g의 크기로 500 ml의 LS액체배지가 담긴 5 L의 배양기에 넣어 2주간 배양을 하고, 배양 종료 후 2.0 g의 세포를 채취하여 PHB geranyltransferase와 PHB glucosyltransferase의 활성을 조사하였다.

PHB geranyltransferase는 shikonin의 합성과정에서 매우 중요한 역할을 하는 효소로서 배지조성이나 배양환경에 많은 영향을 받는다. 본 실험에서 볼 때 622-46의 세포주의 경우 LS배지에서도 PHB geranyltransferase가 어느 정도의 높은 활성을 보이고 있었으며, 2 Gy의 저선량  $\gamma$ -ray의 조사에 따라 약 68%의 증가율을 보였고, 16 Gy의 조사에서는 83%의 증가를 보여 세포주의 선발에 따라 이 효소의 활성을 높일 수가 있다는 것을 알 수 있었으며 특히 저선량의  $\gamma$ -ray의 조사에 따라 활성을 증대시킬 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

일반적으로 지치의 세포배양에서 LS배지에서는 shikonin의 합성이 매우 저조한 것으로 보고되고 있다. 이에 대한 큰 원인으로서는 LS배지에 존재하는 비교적 고농도의 ammonium이 PHB glucosyltransferase의 활성을 증가시키며 *p*-hydroxybenzoic acid가 glucoside의 형태로 축적이 되면서 세포에서의 shikonin의 합성을 억제한다고 보고 있다(Heide *et al.* 1989, Fujita *et al.* 1981). 그러나 본 실험에서는 Fig. 15에서 보여 주듯이 저선량의  $\gamma$ -ray의 조사에 따른 PHB glucosyltransferase의 활성에 있어 2 Gy에서 36.6 pkat와 16 Gy에서 38.2 pkat로 무조사구의 43.1 pkat에 비해 다소 감소하는 경향을 보이기는 하였지만 큰 변화를 볼 수가 없었다. 다만 *p*-hydroxybenzoic glucoside의 양적조사가 필요하였다.

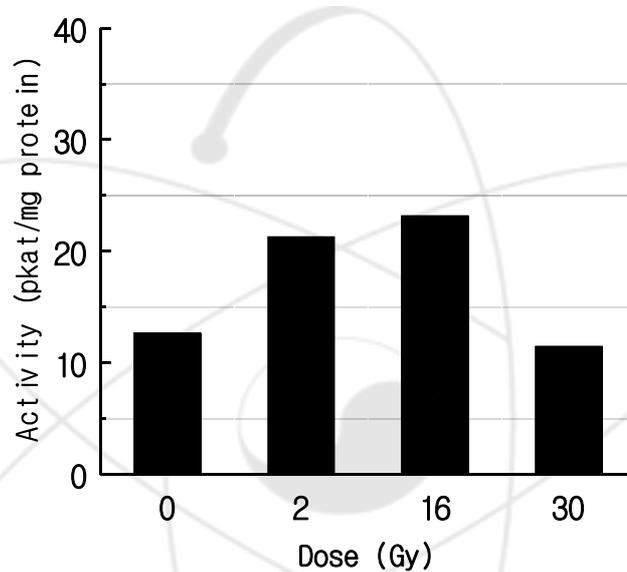


Figure 14. PHB geranyltransferase activities in cell suspension culture of cell line 622-46 of *L. erythrorhizon* irradiated with  $\gamma$  radiation in LS medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark for 14 days.

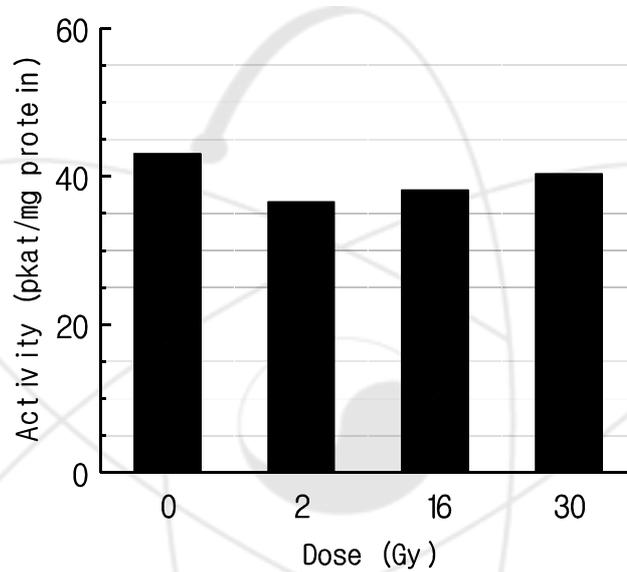


Figure 15. PHB glucosyltransferase activities in cell suspension culture of cell line 622-46 of *L. erythrorhizon* irradiated with  $\gamma$  radiation in LS medium containing BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in the dark for 14 days.

### 3. 지치의 형질전환을 위한 *Agrobacterium rhizogenes*의 gene transformation

#### 1) Vector Construction

Intron을 가지고 있는 GUS( $\beta$ -glucuronidase) gene을 Yazaki 등 (1998)의 방법에 따라 binary vector pBin19에 subclone하였다. 아울러 형질전환된 hairy root를 선발하기 위해 hygromycin phosphotransferase gene도 동시에 T-DNA 영역안에 삽입하여 Fig. 16과 같은 구조의 두 가지 gene을 갖는 binary vector를 작성하였다.

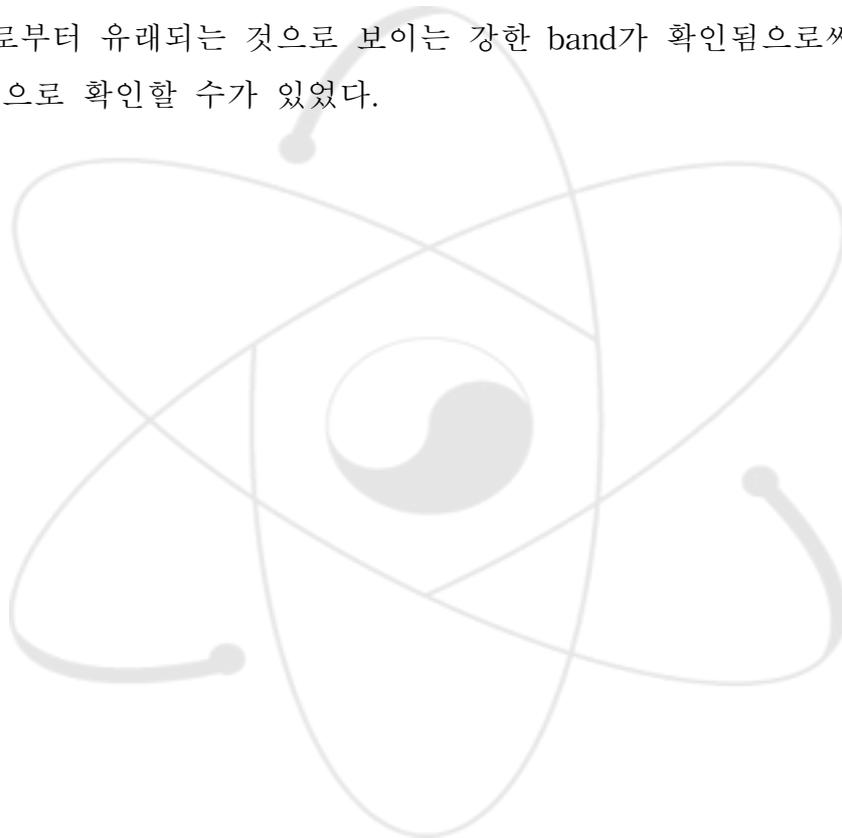
#### 2) 지치 seedling에의 *A.rhizogenes* infection

지치의 종자를 MS배지에 무균적으로 파종하여 25°C에 암조건으로 발아시킨 후 하배축이 2-4cm 정도 신장하였을 때 절단, 채취하여 재료로 binary vector를 포함한 *A.rhizogenes* strain 15834를 접종하여 0.8% agar를 함유한 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고체배지에 치상한 후 25°C에 광조건으로 *A.rhizogenes*와 2일간 공조배양한 후, 멸균 증류수로 외식체로 부터 bacteria를 세척해 낸 다음 3% sucrose, 0.8% agar 및 250 mg · L<sup>-1</sup> cefotaxime이 첨가된 MS고체배지에 다시 치상하여 25°C에서 배양하여 Fig. 17과 같이 하배축으로부터 hairy root를 얻을 수가 있었다.

1개월 정도의 배양에서 hairy root가 발생한 후에 25 mg · L<sup>-1</sup> hygromycin을 첨가한 MS배지에 옮겨 배양하면서 hygromycin에 대하여 내성을 갖고 생존하고 있는 이식체들을 형질전환된 개체로 판단하여 선발

하였고, M-9배지에서 배양하고 있는 이들 hairy root의 근단부에는 Fig. 18에서 보여 주듯이 shikonin의 합성에 의한 것으로 보이는 적색 색소의 축적이 확인되었다.

또한 이들 hairy root를 공시하여 Fujita 등 (1998)에 의한 방법에 따라 PCR로 GUS gene의 삽입을 확인하였다. 이 결과 Fig. 19에서와 같이 hygromycin에 대한 내성이 있는 hairy root에서는 750 bp에서 GUS gene으로부터 유래되는 것으로 보이는 강한 band가 확인됨으로써 형질전환된 것으로 확인할 수가 있었다.



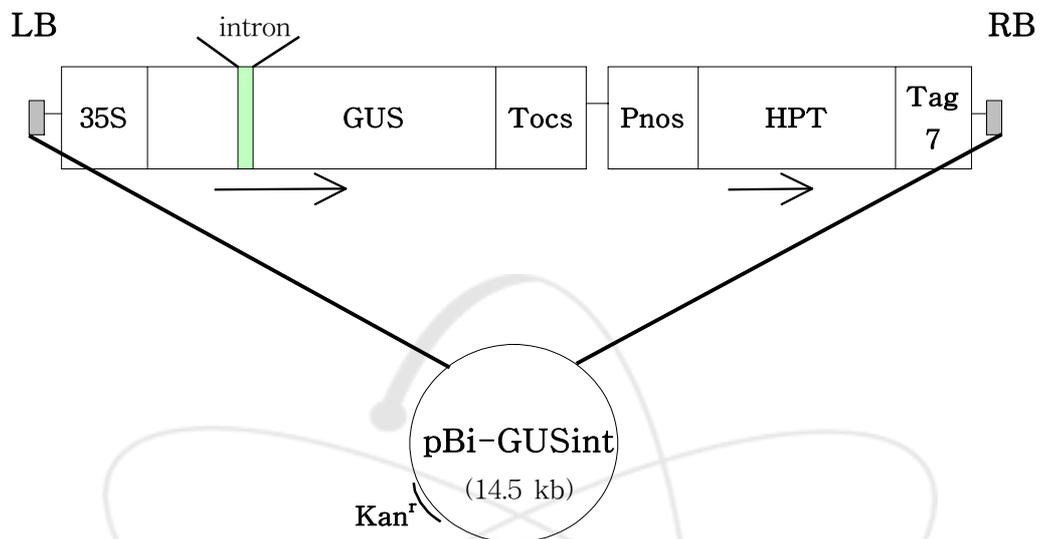


Figure 16. Binary vector construct carrying GUS as the reporter gene. The promoter is CaMV 35 S, and the terminator Tnos. HPT is the selection marker for transgenic plants.



Figure 17. Hairy roots of *L. erythrorhizon* grown on MS medium. Left, non-transformed root; right, hairy root after 40 days of growth.

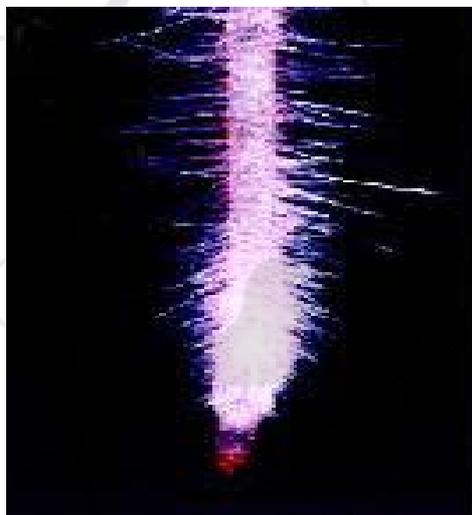


Figure 18. Root tip grown on M-9 medium showing normal pigment production pattern in border cells and root hairs.

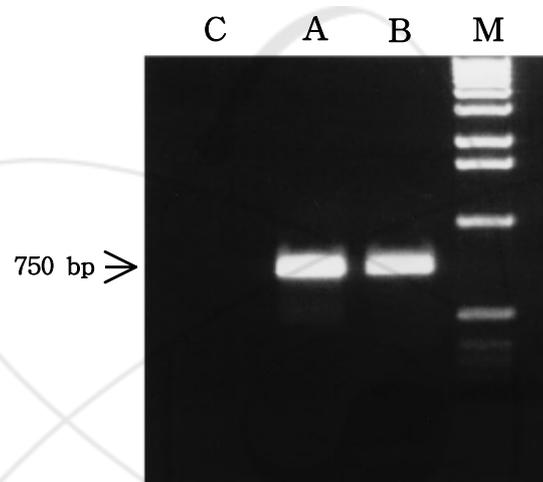


Figure 19. PCR products amplified from genomic DNA of hairy roots. PCR in which a pair for detecting the GUS gene was used. C, the control hygromycin-sensitive hairy roots; A and B, the GUS clone; M, the DNA ladder used as the size marker

## 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

본 실험은 지치의 callus를 배양하면서 callus의 성장 및 shikonin 유도체의 생성량이 우수한 세포주를 선별하였고, callus에 13C-1을 조사한 후 bioreactor를 이용한 세포현탁배양에서 촉진효과와 shikonin합성 효과를 조사하면서 이 때  $\text{Cu}^{2+}$ 와 jasmonate의 효과에 관하여도 검토하였다. 또한 저선량 13C-1 조사에 따른 shikonin합성의 변화의 원인 구명으로서 shikonin합성 대사과정에서의 주요 enzyme으로 작용하는 *p*-hydroxybenzoic geranyltransferase와 *p*-hydroxybenzoic glucosyltransferase의 활성을 조사하였다. 아울러 shikonin의 대량생산을 목표로 지치의 세포를 *Agrobacterium rhizogenes*로 형질전환시켜 hairy root를 발생시켰다.

### 1. Shikonin의 대량생산 우량 세포주의 지속적인 선발

Callus를 지속적으로 BA 2 mg · L<sup>-1</sup>와 IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>를 첨가한 LS(Linsmeir and Skoog, 1965) 고체배지상에서 25±2℃의 암조건에서 3주간격으로 지속적인 계대배양을 하면서 shikonin합성이 양호할 것으로 예측되는 세포주를 선별해 나간 결과 몇 가지의 세포주를 선발하였다.

이와 같이 선발된 세포주 들 중 고체배지상에서 shikonin 합성이 비교적 양호한 것으로 판단된 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 공시하여 BA 2 mg · L<sup>-1</sup>와 IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>를 첨가한 LS고체배지에서 암배양할 때 callus의 증식이 완성하였을 뿐 아니라 callus에서의 shikonin 분비도 비교적 양호하였다.

이 들 각 세포주 10 g의 callus를 BA 2 mg · L<sup>-1</sup>와 IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>를

첨가한 LS액체배지에서 암조건으로 3주간 배양한 후 세포의 증식과 shikonin 합성량을 측정한 결과 생체중의 증가는 특히 622-46 line에서 가장 양호하였으 고체배지에서의 생육보다는 세포의 생체중 증가속도는 훨씬 저조한 편이었다. Shikonin의 생성에 있어서도 622-46 line에서 월등하게 높았다.

선발된 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 배양하면서 shikonin 합성에 대한  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과를 조사하고, 아울러 jasmonate의 효과를 검토한 결과, M-9배지에서도 622-46 line의 세포주에서 다른 line에 비해 shikonin의 합성이 현저하게 양호하였고,  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에 있어서는 1.0  $\mu\text{M}$ 의 처리에서 42%의 증가효과를 얻을 수가 있었으며, 이는 *p*-hydroxybenzoic acid가 *p*-hydroxybenzoic glucoside로 넘어가지 않고 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic로 넘어가는 과정에서  $\text{Cu}^{2+}$ 가 촉진하는 효과가 있는 것으로 본다. 그러나  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에 있어서도 0.1  $\mu\text{M}$ 과 같은 저농도에서는 효과가 거의 없는 것으로 파악되었다.

Shikonin의 생합성에서의 methyl jasmonate의 효과에 있어서도 100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 경우 무처리레 비해 약 2배에 가까운 증가를 보였으며 특히 0.1  $\mu\text{M}$ 의  $\text{Cu}^{2+}$ 와 동시에 처리하였을 때에는 단독처리에 비해 다시 2배에 가까운 증가율을 보이고 있다. 이는 methyl jasmonate도  $\text{Cu}^{2+}$ 의 효과에서와 같이 *p*-hydroxybenzoic acid가 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid로 넘어가는 과정을 촉진하는 것으로 본다.

이 결과로 볼 때 일반적으로 지치의 세포배양에서 shikonin을 생산할 경우에는 세포주의 증식단계에 이용하는 배지 및 환경조건과 shikonin 합성에 도입하는 배지 및 환경조건이 각각 다른 2단계 배양법을 사용하고 있지만 세포주의 선발에 따라 세포 증식배지인 LS배지에서의 배양만으로도 shikonin 생성의 유도가 충분히 가능한 것으로 확인되었다.

## 2. 저선량 방사선 조사에 의한 지치의 Cell Suspension Culture로 Shikonin 생산성 향상 검토

1차적으로 선발된 지치세포주 중 shikonin생성이 가장 양호한 것으로 판단된 622-46의 callus를 주종세포주로 결정하여 3주간 계대배양한 후 0, 2, 16 및 30 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 10 g의 크기로 500 ml의 LS액체배지에 넣어 3 L의 bioreactor에서 14일간 암조건으로 현탁배양한 결과 배양배지와 배양세포로부터 매우 선명하고 깨끗한 색소물을 추출할 수가 있었다.

배양배지에서의 shikonin의 합성량은 2 Gy 조사구에서  $21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 다른 조사구에 비해 월등하게 높게 나타났고, 반면에 배양세포로부터 추출한 경우에는 배지용액의 경우와 다르게 16 Gy 조사구에서  $63.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 shikonin의 합성 및 축적이 현저하게 높았음을 보여주었다. 이상의 결과로 볼 때, 연구에서 shikonin 생산에 매우 유효성이 높은 세포주 622-46이 선발되었으며, 이 세포주를 사용할 경우 세포증식으로만 사용되는 LS배지에서도 shikonin의 생산에 있어 세포증식용 배지와 shikonin합성용 배지를 구분하여 세포를 배양하는 2원 배양법에서 탈피하여 동일배지에서의 연속배양에서도 공시세포주에 2 Gy나 또는 16 Gy의 저선량  $\gamma$ 선을 조사함으로써 아주 효율적으로 shikonin을 생산할 수 있을 것으로 확인되었다.

선발된 지치세포주 622-46의 callus를 공시하여 shikonin 합성에 효과가 가장 양호하였던 2 Gy의  $\gamma$ 선을 단독으로 조사한 후 10 g의 재료를 3 L의 BA  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 IAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 LS 액체배지에 넣어 7 L의 bioreactor로 14일간 배양한 결과, 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 처리구에서 뚜렷한 효과를 보이고 있었다. 배지 용액과 배양 세포주를 분리하여 shikonin을 추출한 결과, 배지 내 용출된 shikonin의 양은  $1.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이었는데 비해 2Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 배양

한 배지 내에서의 양은  $21.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 으로 현저한 차이를 보였으며, 배양 세포들로부터 추출한 shikonin의 양도 대조구의  $16.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에 비해 2 Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 배양한 세포에서 추출한 shikonin의 양은  $21.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 으로 높은 수치를 보이고 있었다.

선발된 세포주 622-46의 callus를 주종세포주로 3주간 계대배양한 후에 2Gy의  $\gamma$ 선을 조사한 후 10 g의 크기로 500 ml의 LS액체배지가 담긴 5 L의 배양기에 넣어 2주간 배양을 하고, 배양 종료 후 PHB geranyltransferase와 PHB glucosyltransferase의 활성을 조사하였다.

PHB geranyltransferase는 shikonin의 합성과정에서 매우 중요한 역할을 하는 효소로서 배지조성이나 배양환경에 많은 영향을 받는다. 본 실험에서 볼 때 622-46의 세포주의 경우 LS배지에서도 PHB geranyltransferase가 어느 정도의 높은 활성을 보이고 있었으며, 2 Gy의 저선량  $\gamma$ -ray의 조사에 따라 약 68%의 증가율을 보였고, 16 Gy의 조사에서는 83%의 증가를 보여 세포주의 선발에 따라 이 효소의 활성을 높일 수가 있다는 것을 알 수 있었으며 특히 저선량의  $\gamma$ -ray의 조사에 따라 활성을 증대시킬 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

저선량의  $\gamma$ -ray의 조사에 따른 PHB glucosyltransferase의 활성에 있어서는 2 Gy에서 36.6 pkat와 16 Gy에서 38.2 pkat로 무조사구의 43.1 pkat에 비해 다소 감소하는 경향을 보이기는 하였지만 큰 변화를 볼 수가 없었다.

### 3. 지치의 형질전환을 위한 *Agrobacterium rhizogeses*의 gene transformation

Intron을 가지고 있는 GUS( $\beta$ -glucuronidase) gene을 Yazaki 등 (1998)의 방법에 따라 binary vector pBin19에 subclone하였다. 아울러

형질전환된 hairy root를 선별하기 위해 hygromycin phosphotransferase gene도 동시에 T-DNA 영역안에 삽입하여 이 둘 두 가지 gene을 갖는 binary vector를 작성하였다.

지치의 종자를 MS배지에 무균적으로 파종하여 25℃에 암조건으로 발아시킨 후 하배축을 채취하여 binary vector를 포함한 *A.rhizogenes* strain 15834를 접종하여 hairy root를 얻을 수가 있었다.

1개월 정도의 배양에서 hairy root가 발생한 후에 25 mg · L<sup>-1</sup> hygromycin을 첨가한 MS배지에 옮겨 배양하면서 hygromycin에 대하여 내성을 갖고 생존하고 있는 hairy root의 근단부에는 shikonin의 합성에 의한 것으로 보이는 적색 색소의 축적이 확인되었다.

또한 이 들 hairy root를 공시하여 PCR로 GUS gene의 삽입을 확인한 결과, hygromycin에 대한 내성이 있는 hairy root에서는 750 bp에서 GUS gene으로부터 유래되는 것으로 보이는 강한 band가 확인됨으로써 형질전환된 것으로 확인할 수가 있었다.

본 과제로 대학원 석사가 1인 배출 되었고, 현재 박사과정 1인과 석사과정 1인 및 학부생 2인이 논문과제로 연구 중에 있으며, 지속적인 연구의 가능성이 있다고 확신한다. 본 연구에서 얻어진 결과로 국내학회에서 1회 발표를 하였고, 현재 1편을 준비 중에 있다.

## 제 5 장 연구결과의 활용계획

본 연구에서 얻어진 결과를 토대로 저선량 11선의 조사에 따른 지치 세포의 성장과 shikonin 합성의 효과를 증대시키기 위하여 다음과 같은 연구를 지속해서 진행함과 동시에 대량생산을 위한 탱크배양의 기반을 조성하고자 현재 7 L fermentor 3기를 도입하여 성공적으로 연구가 끝났으므로 대량배양으로의 확대방안을 구상 중에 있다.

- o 11선의 조사에 따른 중간 대사물에 관한 검토
- o Shikonin의 대량생산을 위한 Tank Culture System 확립
- o 형질전환된 hairy root를 이용한 shikonin 생산 system의 확립
- o 본 연구내용의 특허출원

### - 연구추진 내역

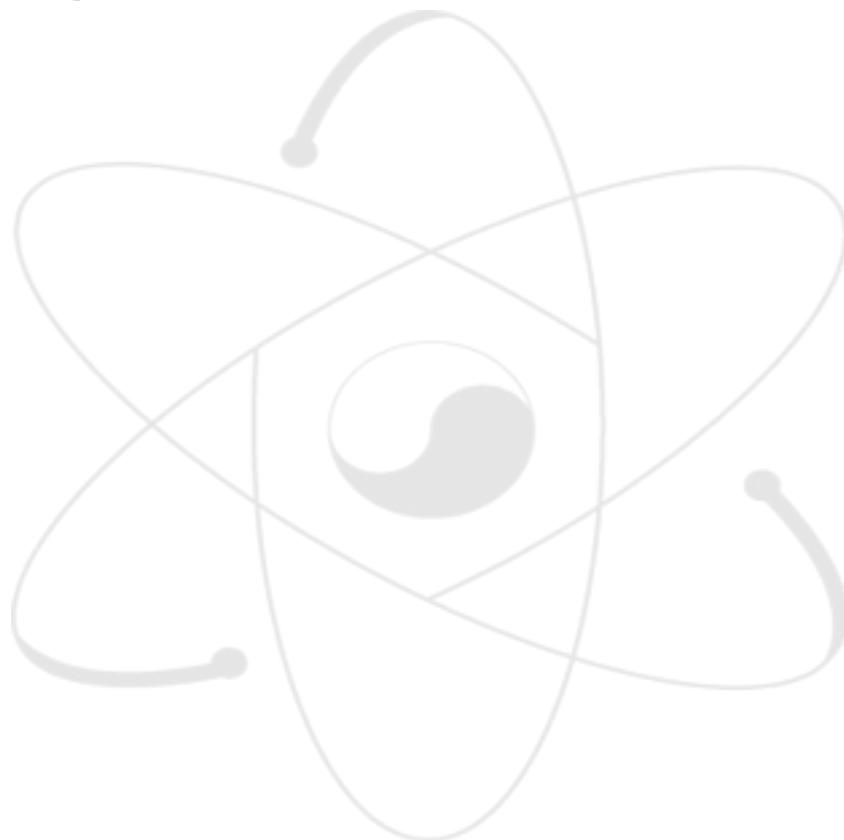
- (1) 11선의 조사에 따른 체내효소의 활성 및 중간 대사물에 관한 검토
  - 1-1. GHQ 3"-hydroxylase의 활성
  - 1-2. HB-O-glucoside의 양적 검토
- (2) 11선의 조사에 따른 지치의 cell suspension culture에서의 shikonin 생산
  - 2-1. Cell suspension culture에 의해 생산된 shikonin의 정제화
  - 2-2. 형질전환된 hairy root를 이용한 shikonin 생산 system 확립
  - 2-3. 공업용 대형 bioreactor culture system에 의한 shikonin의 대량생산

## 제 6 장 참 고 문 헌

1. Fujita Y. et al. (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Reports 1: 59-60.
2. Fujita Y. et al. (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Reports 1: 61-63.
3. Fujita Y. et al. (1983) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Reports 2: 192-193.
4. Fukui H et al. (1992) An unusual metabolite, dihydroechinofuran, released from cultured cells of *Lithospermum erythrorhizon*. Phytochemistry 31: 519-521.
5. Gaisser S. and L. Heide (1996) Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*. Phytochemistry 41: 1065-1072.
6. Heide L. and M. Tabata (1987) Geranylpyrophosphate: p-hydroxybenzoate geranyltransferase activity in extracts of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. Phytochemistry 26(6): 1651-1655.
7. Heide L. et al. (1989a) Incorporation of shikimic acid into p-hydroxybenzoic acid in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. Phytochemistry 28: 2643-2645.
8. Heide L. et al. (1989b) Enzymatic regulation of shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures.

- Phytochemistry 28(7): 1873-1877.
9. Kazufami H. et al. (1997) Effects of methyljasmonate on shikonin and dihydroechinofuran production in *Lithospermum erythrorhizon* cell culture. Plant Cell Physiol. 38(7): 776-782.
  10. Kim S. G. and H. J. Yu (1991) Production of shikonin derivatives by cell lines of *Lithospermum erythrorhizon*. 식물조직배양학회지 18(5): 313-321.
  11. Linsmaier E M and F. Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.
  12. Löscher and Heide (1994) Biosynthesis of p-hydrobenzoate from p-coumarate and p-coumaroyl-coenzyme A in cell-free extracts of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. Plant Physiol. 106: 271-279.
  13. Maeda Y. et al. (1983) Callus formation from protoplasts of cultured *Lithospermum erythrorhizon* Cells. Plant Cell Reports 2: 179-182.
  14. Mizukaki H. et al. (1977) Effects of nutritional on shikonin derivatives formation in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures . Phytochemistry 16: 1183-1186.
  15. Mühlenweg et al. (1998) 4-Hydroxybenzoate 3-geranyltransferase from purification of a plant membrane-bound penyltransferase. Planta 205: 407-413
  16. Sommer et al. (1995) Intracellular localization of geranylpyrophosphate synthase from cell cultures of

- Lithospermum erythrorhizon*.(1995) *Phytochemistry* 38: 623-627.
17. Tanaka M. et al.(1974) Pigment formation in callus culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 13: 927-932.
18. Yamamoto H. et al. (2000) Geranylhydroquinone 3''-hydroxylase, a cytochrome P-450 monooxygenase from *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Planta* 210: 312-317.



서 지 정 보 양 식

서 지 정 보 양 식					
수행기관보고서번호		위탁기관보고서번호		표준보고서번호	
KAERI/RR-2461/2003					
제목 / 부제		세포배양 및 형질전환체 배양에서 방사선을 이용한 Shikonin 생산증대			
연구책임자 및 부서명		김재성 (한국원자력연구소 방사선이용연구부)			
연구자 및 부서명		이영근 (한국원자력연구소 방사선이용연구부), 정병엽(한국원자력연구소 방사선이용연구부), 이영복(충남대학교), 황혜연(충남대학교)			
출판지	대전	발행기관	KAERI	발행년	2004년
페이지	49 p	도표	있음( ○ ), 없음( )	크기	21 x 29.5 Cm
참고사항	없음				
비밀여부	공개(○), 대외비( ), 급비밀		보고서종류	연구보고서	
연구수행기관	한국원자력연구소		계약번호		
<p>초록(15-20줄내외)</p> <p>장기간 배양에서 shikonin 합성이 양호한 679, 679-29 및 622-46의 세 가지 세포주를 선발하였고, 이들 세포주를 LS배지에서 배양한 결과 shikonin 합성량증가는 622-46 line에서 양호하였다. M-9배지에서도 622-46 line의 세포주에서 다른 line에 비해 shikonin의 합성이 현저하게 양호하였고, Cu<sup>2+</sup>와 methyl jasmonate의 효과도 동시에 인정되었다. 저선량의 <math>\gamma</math>-ray에 의한 shikonin의 합성증가 효과는 배지용액에서는 2 Gy 조사구에서 월등하게 높게 나타났고, 배양세포로부터 추출한 경우에는 16 Gy 조사구에서 현저하게 높았다. 이상의 결과로 볼 때, 연구에서 shikonin 생산에 매우 유효성이 높은 세포주 622-46이 선발되었으며, 이 세포주를 사용할 경우 세포 증식용 LS배지에서도 shikonin의 생산이 가능해 2원배양법에서 탈피하여 동일배지에서의 연속배양에서도 공시세포주에 2 Gy나 또는 16 Gy의 저선량 <math>\gamma</math>선을 조사함으로써 아주 효율적으로 shikonin을 생산할 수 있을 것으로 확인되었다. 622-46세포주의 경우 2 Gy와 16 Gy 저선량 <math>\gamma</math>-ray의 조사에서 PHB geranyltransferase가 높은 활성을 보였다. GUS와 HPT gene을 내장한 binary vector를 포함한 <i>A.rhizogenes</i> strain 15834를 접종하여 hary root를 얻을 수가 있었다.</p>					
주제명 키워드 (10단어내외)		지치, 감마선, 세포배양, shikonin, Cu <sup>2+</sup> , methyl jasmonate, PHB geranyltransferase, Agrobacterium rhizogeses, hary root			

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET						
Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard No.	Report	INIS Subject Code		
KAERI/RR-2461/200 3						
Title/Subtitle	Enhancement Effect of Shikonin in Cell Suspension Culture and Transferrant Culture by Radiation Application					
Project Manager and Department	Kim, Jae-Sung (Radiation Application Research Division )					
Researcher and Department	Lee, Young-Keun, Chung, Byung Yeoup, Lee, Young Bok, Hwang Hye Yeon					
Publication Place	Taejon	Publisher	KAERI	Publication Date	2004	
Page	49 p.	Ill. & Tab.	Yes( <input type="radio"/> ), No ( <input type="radio"/> )	Size	21 x 29.5 Cm	
Note						
Classified	Open( <input type="radio"/> ) Document	Restricted( <input type="radio"/> ),	_Class	R e p o r t Type	Research Report	
Performing Org.	KAERI		Contract No.			
<p>Abstract(15-20 Lines)</p> <p>The cell lines 679, 679-29 and 622-46 of <i>L. erythrorhizon</i> could be selected on LS agar medium for the production shikonin in cell suspension culture. The shikonin was increased moderately in suspension culture of cell line 622-46 in LS liquid medium containing BA 2 mg · L<sup>-1</sup> and IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> in the dark, and was increased by adding 1 μM Cu<sup>2+</sup> and 100 μM methyl jasmonate</p> <p>The accumulation of shikonin in the liquid medium was increased significantly by 2 Gy irradiation to callus of cell line 622-46 and culture in LS liquid medium containing BA 2 mg · L<sup>-1</sup> and IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> in the dark and shikonin in cell debris was higher by 16 Gy irradiation. The activity of <i>p</i>-hydroxybenzoate geranyltransferase was increased by irradiation of 2 Gy and 16 Gy of γ radiation.</p> <p>Seedling hypocotyles of <i>L. erythrorhizon</i> were infected with <i>Agrobacterium rhizogenes</i> strain 15834 harboring a binary vector with an intron bearing the GUS (β-glucuronidase) gene driven by cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter as well as the HPT (hygromycin phosphotransferase) gene as the selection marker. Hairy roots isolated were hygromycin resistant and had integrated GUS gene in DNA. The root tip grown on M-9 medium showed normal pigment production pattern in border cells and root hairs.</p>						
Subject Keywords (About 10words)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> , γ-radiation, cell suspension culture, shikonin, Cu <sup>2+</sup> , methyl jasmonate, PHB geranyltransferase, <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , hairy root					

