Korean Jour. Botany
Vol. 17, No. 1, 9—14(1974)

Alantolactone이 植物生長에 미치는 影響과 L-Cysteine과의 相互作用

權 寧 命
(서울大學校 文理科大學 植物學科)

Inhibitory Effect of Alantolactone on the Growth of Plant and Interaction with L-Cysteine

Kwon, Young Myung
(Department of Botany, Seoul National University)

ABSTRACT

Inhibitory effect of alantolactone and isoalantolactone was shown in Avena straight growth test and in the formation of adventitious root in Phaseolus seedling. However, di-, and tetrahydroalantolactones were given no effect on the elongation and the rooting.

Inhibitory effect of alantolactone could partly be removed by cysteine, cystine, and reduced glutathione. The plant materials were made less sensitive to alantolactone by the pretreatment of cysteine, but cysteine supplied after the treatment of alantolactone brought about no effect on the action of alantolactone.

A new spot was shown on TLC plate from the mixture of alantolactone and cysteine, indicating that alantolactone can be inactivated by cysteine, not cystine, without any biological processes.

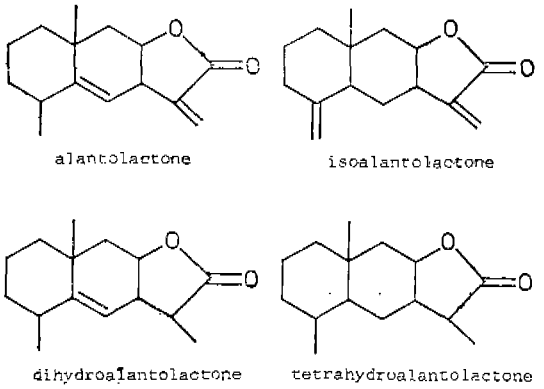
緒 論

Sesquiterpene lactone은 主로 菊花科植物에서 分離되는 化合物로서 지금까지 약 100여가지가 알려졌고, 그중 相當數가 生物學的 活性을 가졌음이 報告되어있다(Kupchan, et al., 1970; Lee, et al., (1971). 이러한 化合物들은 흔히 生體에 對하여 높은 毒作用을 나타내기 때문에 培養中인 細胞나 組織의 增殖을 크게 抑制한다(Bialecki, et al., 1973; Kupchan, et al., 1970; Kupchan, et al., 1971; Lee, et al., 1971; Pettit and Cragg, 1973).

그러나 一部 락톤들은 生體에 對하여 促進的인 效果를 나타내는 것들이있다. Pyrethrosin과 heliangine等은 植物에서 不定根의 發生을 促進시키며(Shibaoka, et al., 1967b), sagebrush(쑥의 一種)에서 分離된 sesquiterpene lactone들은 植物의 呼吸을 增加시킨다(McCahon, et al., 1974). Alantolactone도 植物의 呼吸을 增加시킬 수 있음이 報告되었으며, 이러한 效果는 植物種類에 따라 다르고, 또한 實驗條件에 依해서 結果가 달라짐이 알려졌다(Kwon, et al., 1973).

이러한 락톤의 活性은 시스테인의 存在下에서 크게 減少되며 이때 시스테인과 락톤은 서로 反應하여 새로운 化合物을 만들게 된다(Kupchan, 1970; Shibaoka, et al., 1967a). Alantolactone의 作用性도 시스테인에 依하여 감소되지만, 이에 對한 상세한 硏究는 아직 報告된 바 없다(Dalvi, et al., 1971). 本實驗에서는

alantolactone의 生物學的作用性을 보다 상세히 파악하고 또한 시스테인과의 相互作用도 究明해보고져 alantolactone, isoalantolactone, dihydroalantolactone, tetrahydroalantolactone等이 *Phaseolus*의 不定根發生과 *Avena* coleoptile의 신장생장에 미치는 영향과 시스테인의 効果를 조사검토하여 보았다.



實驗材料 및 方法

Alantolactone과 그의 유도체:Alantolactone과 isoalantolactone은 *Inula helenium* L.의 뿌리에서 分離하였고(Kwon, et al., 1973) dihydroalantolactone과 tetrahydroalantolactone은 alantolactone과 isoalantolactone을 각각 수소첨가하여 합성하였다(Marshall and Cohn, 1964).

生長實驗 : *Avena sativa* L. Clinton을 暗所에서 3日間 發芽시킨後, coleoptile의 頂端部을 4mm되게 절단해버리고(이때 分裂組織이 完全히 제거되어야함) 다시 正確히 6mm를 절단하여 coleoptile切片을 만들어 實驗에 使用하였다. 切片은 1μg의 IAA가 첨가되여있는 10m*l*의 2% 설탕용액이 들어있는 샤레에 넣고 暗所에서 20時間 培養하는데, 이때 락톤이나 또는 시스테인을 첨가한다. 培養後 增加한 切片의 길이를 測定하여 對照群과 비교하였다(Shibaoka, et al., 1967a).

不定根의 發生實驗 : 暗所에서 發芽시킨 *Phaseolus vulgaris* L.의 seedling을 다시 光下(400촉광)에서 4~5日間 培養한후 實驗材料로 하였다. 먼저 hypocotyl를 2cm部分만 남기고 뿌리부분을 절단하였으며, 子葉을 제거한 뒤에, 락톤이나 시스테인이 첨가된 수용액에 24時間 침적시켰다가 다시 멸균된 수도수에 옮기고, 光下에서 4日間 培養한뒤 發生한 不定根의 數를 세었다(Shibaoka, et al., 1967b).

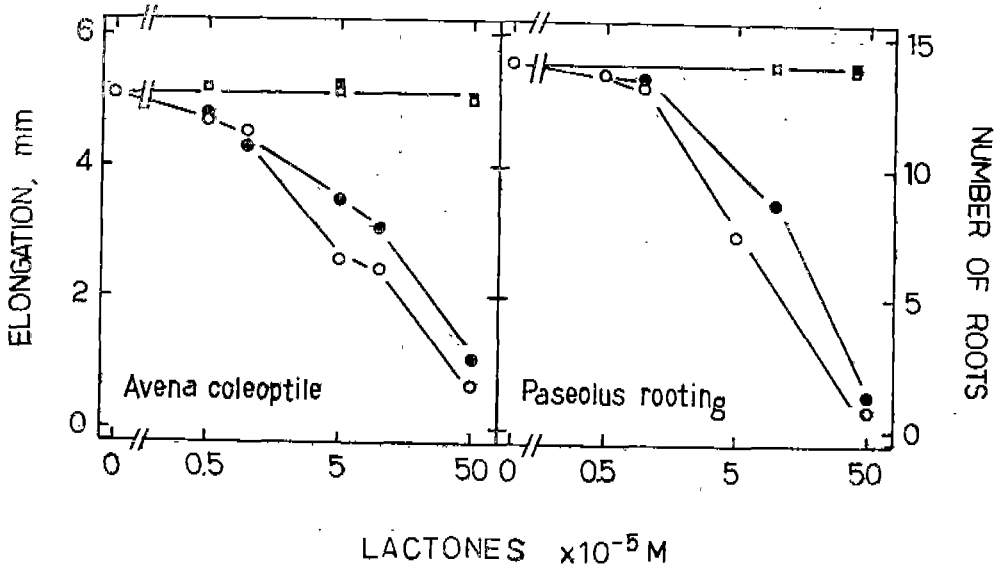


Figure 1. Effects of alantolactone and its related compounds on the IAA induced elongation of Avena coleoptile sections and on the Phaseolus rooting.

Initial length of Avena sections was 6.0mm. Average 20 sections were used. Incubation was kept at 27°C for 20hr under the darkness.

Average 16 Phaseolus cuttings were used. Incubation was kept at 25°C under the contineous illumination for 4 days after the treatment of the lactones. ○·····○ alantolactone; ●·····● isoalantolactone; □·····□ dihydroalantolactone; ■·····■ tetrahydroalantolactone.

Table 1. *Effects of cysteine on the inhibitory activities of alantolactone in Phaseolus rooting and Avena straight growth test.*

Conc M	Number of roots[1]		Elongation of coleoptile sections, mm[2]	
	−alanto.	+alanto.	−alanto.	+alanto.
H_2O	13.4±0.19	6.5±0.34	4.84	1.98
Cysteine, 2×10^{-4}	14.6±0.44	12.4±0.56	5.15	3.65
Cystine, 10^{-4}	14.0±0.36	11.8±0.12	4.03	3.17
Glutathione(reduced) 2×10^{-4}	13.8±0.28	10.7±0.22	5.17	3.10
Glycine, 2×10^{-4}	13.6±0.84	7.3±0.47	5.44	1.42
Tryptophan 2×10^{-4}	12.0±0.43	6.9±0.16	4.48	2.23
Guanosine, 2×10^{-4}	14.0±0.54	8.0±0.37	5.34	2.26

1) Average 20 cuttings were used with standard error.
2) Average 18 coleoptile sections were used. Initial length of sections was 6.0mm. The concentration of alantolactone was 5×10^{-5}M.

박층크로마토그라피 : 알콜에 溶解된 락톤과 0.2N인 산완충액(pH 7.2)에 용해된 아미노酸용액을 서로 混合(1 : 1)하고, 24時間 방치한 뒤 감압농축한후, TLC로 새로운 spot의 生成有無를 調査하였다. TLC에는 silica gel G를 사용하였고, 展開溶媒로는 BuOH: HAc: H_2O(3 : 1 : 1)를 택하였다. Spot의 檢出에는 黃酸, ninhydrin 및 자외선등을 사용하였다(Woo, 1972).

結果 및 考察

IAA에 依하여 유발된 Avena切片의 신장생장은 alantolactone과 isoalantolactone에 依해서 크게 억제되었다(Fig. 1;Table 1). 즉 alantolactone(5×10^{-5}M)은 약 50%의 억제를 나타내었고, isoalantolactone도 같은 결과를 보였다. 그러나 di-, 또는 tetrahydroalantolactone은 아무런 영향도 미치지 못하였다. 이와같은 alantolactone의 作用은 박테리아, 곰팡이, 이스트, 클로렐라, Phaseolus등의 生長을 억제한다는 사실과 一致한다(Kwon, 1973; Kwon, et al., 1973; Olechnowicz-Stepien and Stepien, 1963; Woo, 1972; Yudovich, 1962).

不定根發生에 미치는 락톤의 영향을 보면(Fig. 1; Table 1), heliangine이나 pyrethrosin의 경우(Shibaoka, et al., 1967b)와는 달리 alantolactone은 저해적으로 作用하였음을 알 수 있다. 즉 alantolactone이 5×10^{-5}M에서는 50%의 억제를 보였으며, 5×10^{-4}M의 경우는 완전히 不定根의 發生을 抑制하였는데 이것은 이미 報告된 結果와 비슷한 것이다(Kwon, 1973). 그리고 di-, 및 tetrahydroalantolactone은 전혀 활성이 없는 것으로 나타났다.

한편 alantolactone의 作用性이 cysteine의 存在로 어떠한 變化를 일으키는지 알기 위하여 시스테인을 비롯한 시스틴, 글루타치온, 글리신, 트립토판과 핵산구성물의 하나인 구아노신을 사용한 結果를 보면, 시스테인, 시스틴, 글루타치온 등은 각각 alantolactone에 依한 저해효과를 80%以上 회복시켰으나 다른 아미노酸과 구아노신은 아무런 영향을 미치지 못하였다(Table 1). 이러한 結果는 SH基를 가진 化合物이 alantolactone과 길항적으로 作用함을 나타내는 것인데, SH基를 갖지못한 시스틴이 시스테인과 동등한 효과를 나타

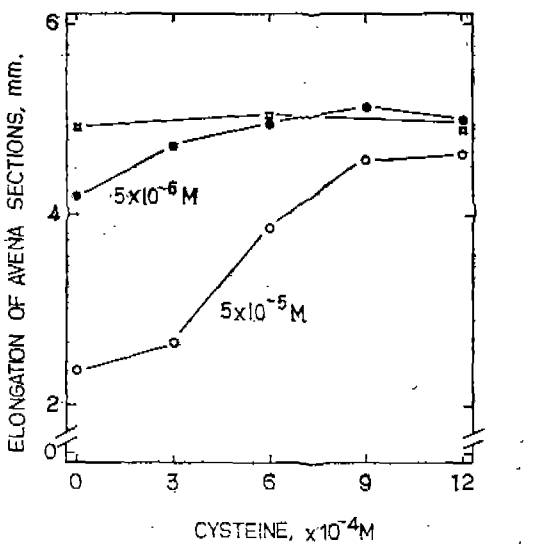


Figure. 2. Interaction between alantolactone and cysteine in Avena straight growth test.

Experimental condition was same as Figure 1.

내는 것은 組織內에 시스틴으로부터 시스테인을 만들 수 있는 酵素가 存在하는 것으로 해석된다(Shibaoka, et al., 1967a).

Alantolactone과 시스테인간의 相互關係를 보다 상세히 파악하기 위하여 두 化合物의 處理時間을 각각 달리 해본결과 시스테인을 前處理하였을 때에만(Table 2) alantolactone의 효과가 감소되였고, 시스테인을 alantolactone보다 후에 處理하면 alantolactone에 의한 저해효과에는 아무런 變化가 일어나지 않음을 알 수 있었다(Table 3). 뿐만 아니라 시스테인의 첨가량을 점진적으로 增加시킬때 락톤에 의한 저해효과도 점차 더욱 크게 감소됨이 관찰되었다(Fig. 2). 이와같은

Table 2. Interactions between alantolactone and cysteine in Phaseolus rooting and Avena straigght growth test.

Treatment		Number of roots[1]	Elongation of coleoptile sections[2], mm.
1st	2nd		
H_2O	H_2O	23.0±0.19	4.32
H_2O	Alantolactone	7.8±0.48	2.48
Cysteine	H_2O	14.2±0.32	5.08
Cysteine	Alantolactone	11.6±0.27	3.50

1) The plant material was treated with 10^{-3}M cysteine for 6 hrs before 18hrs treatments with 5×10^{-5}M alantolactone. Average 18 cuttings were used.

2) Average 15 coleoptile sections were treated with 10^{-4}M cysteine for 6 hrs before 18hrs treatment with 5×10^{-5}M alantolactone. Other conditions were same as Figure 1.

Table 3. Interactions between alantolactone and cysteine in Phaseolus rooting and Avena straight growth test.

Treatment		Number of roots[1]	Elongation of coleoptile sections[2] mm.
1st	2nd		
H_2O	H_2O	11.7±0.43	5.05
H_2O	Cysteine	12.4±0.25	5.93
Alantolactone	H_2O	8.0±0.19	2.47
Alantolactone	Cysteine	8.6±0.75	3.06

1) Average 20 cuttings were treated with 10^{-4}M cysteine for 18 hrs after being treated with 5×10^{-5}M alantolactone for 6 hrs.

2) Average 15 coleoptile sections were treated with 10^{-4}M cysteine for 18 hrs after being treated with 5×10^{-5}M alantolactone for 6hrs. Other conditions were same as Figure 1.

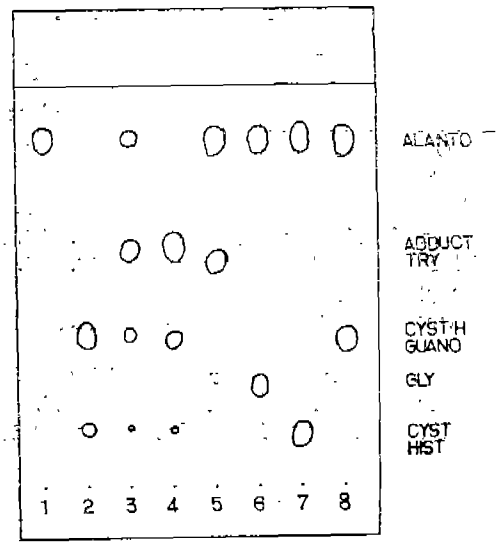


Figure 3. Thinlayer Chromatogram of cysteine adduct of alantolactone.

The equal volume of 90% ethanolic solution of alantolactone(10^{-4}M) and amino acid solution(3×10^{-4}M in 0.2N phosphate buffer) were mixed and incubated for 24 hr at room temperature. Then the mixtures were respectively concentrated under the reduced pressure and spotted on the TLC plate. As a developing solvent, a mixture of n-butanol: acetic acid: water(3 : 1 : 1) was used.

1; alantolactone; 2, cysteine; 3, alantolactone and cysteine(1 : 1;mole: mole); 4, alantolactone and cysteine(1 : 3);5, alanto and tryptophan; 6, alanto and glycine; 7, alanto and histidine; 8, alanto and guanosine.

시스테인의 첨가효과란 alantolactone의 作用性에 대하여 시스테인이 길항적으로 작용함을 의미하는 것이며, 다른 sesquiterpene lactone의 경우처럼(Black, 1966; Shibaoka, et al., 1967a) alantolactone도 시스테인과 첨가반응을 하는 것으로 해석된다.

Alantolactone과 시스테인의 혼합용액으로부터 새로운 物質이 非酵素的으로 生成되였음이 TLC에서 증명되므로서 이러한 生成은 타당한 것으로 밝혀졌다(Fig. 3). 즉, 實驗에 使用된 아미노酸中 시스테인만이 alantolactone과 反應한 것으로 나타났고, 다른 아미노酸과 구아노신은 全혀 反應하지 못하였다. 그리고 isoalantolactone은 시스테인과 反應하였으나, di-, 및 tetrahydroalantolactone은 시스테인과 反應하지 못

하였다. 또한 시스틴이 alantolactone과 반응하지 못하였는데 이상의 結果로부터, C—11의 CH_2基를 가진 락톤만이 시스테인의 SH와 結合하였음을 추정할 수 있겠다(Black, 1966; Kupchan, et al., 1970; Shibaoka, et al., 1967b).

不飽化락톤과 反應할 수 있는 原子團에는 SH基以外에 아민基등을 들 수 있으나(Jones and Young, 1666; Steele, et al., 1959), 生理學的 pH에서 SH基의 反應性은 아민의 경우보다 약 280倍나 크고(Friedman, et al., 1965) 또한 아민과의 反應을 가능케 할려면 生理學的 pH의 범위를 훨씬 벗어나야만하는 것이므로 細胞內에 투입된 alantolactone은 原形質에 存在하는 thiol과 反應할 것이고 그 結果 作用效果가 나타나게 될것이다. 즉 表 2와 3의 경우에서 시스테인을 前處理하면 다량의 SH基가 외부로부터 組織內에 투입되었기 때문에 後에 투입된 alantolactone은 이들 시스테인과 反應하는 율이 높게 되고 組織自體의 thiol과의 化應率은 극히 낮을 것이기 때문에 락톤의 저해효과는 낮게 나타나지만, alantolactone이 組織內에 먼저 투입되어 이미 組織內의 thiol과 反應하게되면 後에 투입된 시스테인은 alantolactone과 反應한다 하더라도 이미 결정된 락톤의 저해효과는 결코 감소될 수 없을 것이다. 왜냐하면 락톤과 시스테인과의 결합은 극히 안정하기 때문이다(Black, 1966; Shibaoka, et al., 1967b). 그리고 C—11의 $=CH_2$는 락톤의 生物學的活性과 가장깊은 關係가 있기 때문에 이러한 作用團이 thiol과 반응하여 變化가 일어나게 되면 락톤의 活性 또한 소실되는 것으로 추정된된다. 그것은 C—11에 $-CH_3$를 가진 di-,와 tetrahydroalantolactone이 不活性이고 alantolactone과 시스테인이 공존할때 alantolactone의 活性이 감소된다는 事實로부터 추리되며, 實際로 시스테인과 結合한 락톤의 活性이 극히 약하다는 사실에서 起因된다(Kupchan, et al., 1970).

한편 植物의 發芽및 生長등에 저해적으로 作用하는 alantolactone과 같은 化合物들이 어떠한 理由로 體內에서 合成되며 또한 生體自身은 어떻게 이들 化合物에 依한 피해에 대처하고 있는가를 究明하는 것은 植物生理學에서 해결해야할 과제의 하나라 사료되는 바이다.

지금까지의 考察로부터 alantolactone은 IAA에 의해서 유발되는 生長과 또한 不定根의 發生을 抑制하는 作用을 가졌고, 시스테인과 反應함으로써 이러한 作用性은 소실된다. 그리고 alantolactone의 作用性은 C—11의 $=CH_2$에 起因되는 것이라 結論 내려지겠다.

摘 要

Alantolactone이 植物生長에 미치는 영향과 시스테인과의 相互關係를 파악하기 위하여, alantolactone, isoalantolactone, dihydroalantolactone, tetrahydroalantolactone을 사용하여 다음실험을 하였다.

1. Alantolactone과 isoalantolactone은 낮은 농도(5×10^{-5}M)에서 Avena coleoptile切片의 生長과 Phaseolus seedling의 不定根發生을 各各 50%씩이나 抑制하였다.

2. 시스테인, 시스틴, 글루타치온은 alantolactone의 生長抑制效果를 크게 감소시켰으며, 特히 시스테인 前處理로 더욱 현저한 감소를 가져올 수 있었다.

3. Alantolactone은 비효소적으로 시스테인과 反應하였으나 시스틴은 반응하지 못하였다.

4. Alantolactone의 生物學的作用性은 C—11의 $=CH_2$로부터 起因된다고 추정된다.

감사의 말씀 : 本硏究를 수행하는데 많은 助言과 도움을 주신 禹源植敎授께 감사드리는 바이다.

REFERENCES

Bialecki, M., E. Bloszyk, B. Drozdz, B. Hladon, and S. Szwemin. 1973. Sesquiterpene lactones VIII. Cytotoxic activity of grosheimin. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 25, 195—9. (from C.A.)

Black, D.K. 1966. The addition of L-cysteine to unsaturated lactones and related compounds. *J. Chem. Soc*(C). 1966, 1123—27.

Dalvi, R.R., B. Singh, and D.K. Salunkhe. 1971. A study of phytotoxicity of alantolactone. *Chem-Biol. Interactions* 3, 13—18.

Friedman, M., J.F. Cavins, and J.S. Wall. 1965. Relative nucleophilic reactivities of amino group and mercaptide ions in addition reactions with α,β-unsaturated compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3672—82.

Jones, J.B. and J.M. Young. 1966. Carcinogenicity of lactones. 1. The reaction of 4-methylbuteno- and 4-methylbutano-γ- lactones with primary amines. *Can. J. Chem.* 44, 1059—68.

Kupchan, S.M., D.C. Fessler, M.A. Eakin, and T.J. Giacobbe. 1970. Relation of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. *Science* 168, 376—7.

———, M.A. Eakin, and A.M. Thomas. 1971. Tumor inhibitor. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.* 14, 1147—52.

Kwon, Y.M. 1973. Some effects of Inula sesquiterpene lactones on the growth and the stem anatomy of Phaseolus vulgaris L. *Korean J. Botany* 16, 12—6.

———, W.S. Woo, L.K. Woo, and M.J. Lee. 1973. Effect of Inula sesquiterpene lactone on the respiration of plants. *Korean Biochem. J.* 6, 85—94.

Lee, K.H., E.S., Huang, C. Piantadosi, J.S. Pagano, and T.A. Geisman. 1971. Cytotoxicity of sesquiterpene lactones. *Cancer Res.* 31, 1649—54.

Marshall, J.A., and N. Cohen. 1964. The structure of alantolactone. *J. Org. Chem.* 29, 3727—29.

Mc Cahon, C.B., K.G. Kelsey, R.P. Sheridan, and F. Shafizadeh. 1974. Physiological effects of compounds extracted from sagebrush. *Bull. Torrey Bot. Club* 100, 23—8.

Olechnowicz-Stepien, W., and S. Stepien, 1963. In vitro and in vivostudies on the activity of helenin and its components against some species of dermatophytes. *Dissertations Pharm.* 15, 17—22.

Pettit, G.R., and G.M. Cragg. 1973. Antineolastic agents. 23. Pseudoguanolide helenalin. *Experimentia* 29, 781—4. (from C.A.)

Shibaoka, H., M. Mitubayashi, and M. Shimokoriyama. 1967a. Promotion of adventitious root formation by heliangin and it removal by cysteine. *Pl. Cell Physiol.* 8, 161—70.

———, M. Shimokoriyama, S. Iriuchijima, and S. Tamura. 1967b. Promoting activity of terpenic lactones in Phaseolus rooting and their reactivity toward cysteine. *Pl. Cell Physiol.* 8, 297—305.

Steele, J.W., J.B. Stenlake, and W.D. Williamson. 1959. Adducts of alantolactone and isoalantolactone with bases. *J. Chem. Soc.* 1959, 2627—8.

Woo, W.S. 1972. Unpublished experimental data.

Yudovich, E.A. 1962. Essential oil in underground organs of Inula grandis. *Tr. Tashkentsk, Farmatsvet. Inst.*, 3, 145—54.

(1974.3.11 접수)