한국농화학회지 제 41 권 제 6 호(1998)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 41, No. 6, pp. 410~413 (1998)

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)에서 생리활성을 보이는 25 kDa 주요단백질 (GMP)의 분리정제

권택헌 · 오세량[1] · 박 훈[2] · 김경현*

고려대학교 생명공학원, [1]생명공학연구소 천연물합성실, [2]한국인삼연초연구원 유전생리3실

초 록 : Gel filtration과 ion exchange chromatography, reversed-phase 및 ion exchange FPLC를 이용하여 고려인삼 뿌리에서 subunit 분자량 약 25 kDa의 주요단백질(이하 GMP)을 분리하였다. PAS 염색을 통하여 GMP는 carbohydrate moiety를 갖는 당단백질일 가능성을 보여주었고, 이는 glycosidase 처리후 protein band shift 실험으로 확인되었다. GMP는 native polyacrylamide 전기영동 및 gel permeation FPLC를 통해 native form은 약 63 kDa의 분자량을 갖는 dimer로 판단된다. GMP의 생리활성 측정결과, inflammation mediator의 기능탐색에 쓰이는 anticomplementary activity를 보여주었다.(1998년 4월 21일 접수, 1998년 10월 15일 수리)

서 론

인삼에 대한 과학적 연구는 19세기에야 시작되었고 1854년 Garriques가 미국삼(*Panax quinquefolium* L.)으로부터 분리한 glycoside를 panaquilon이라고 명명한 것이 인삼의 화학적 성분으로서 보고된 첫 번째 화합물이다.[1] 그 후 1920년경까지는 단순히 식물 생리적 연구가 진행되어 오다가 1957년 Brekhman이 인삼내 saponin 성분이 adaptogen 기능이 있다고 보고하면서부터[2] saponin을 중심으로 약리작용에 대한 연구가 급진전하여 오늘에 이르고 있다. 그러나 인삼에는 saponin 뿐만이 아니라 정유성분,[3] polyacetylene 성분,[4] 페놀성분,[5] 알칼로이드 성분,[6] 다당체,[7] 펩타이드,[8-10] 유리당, 유기산,[11] 비타민 및 무기성분[12] 등 여러 종류의 성분들이 존재하고 있으며 이들이 여러가지 약효를 지니고 있음이 보고되었다. 즉, 인삼은 간을 보호하고 그 기능을 활발하게 하는 효과[13]가 있으며 항피로,[14] 항스트레스 및 저항성 강화에 미치는 효과,[15] 항암작용[16] 등 약리작용이 있으며 이에 따른 생리화학적 및 임상적 연구들이 보고되고 있다. 특히 고려인삼은 항산화활성,[17] 혈소판 응집억제(항혈전작용),[18] 중금속 해독,[19] 암독소 호르몬 활성 억제[20]작용이 있다고 보고되고있다.

인삼은 뿌리 무게가 증가함에 따라 단백질과 총질소 함량이 증가하는 것으로 알려져있다. 더욱이 질소화합물은 의학적 효과뿐만 아니라 인삼의 뿌리성장에 밀접한 관계가 있어 인삼의 가공과 생산에 있어서 품질을 평가하는 기준으로 삼을 수 있다.[21] 인삼의 성분분리 및 생리활성 화합물에 대한 분석적인 접근은 많은 시도가 이루어져 왔지만, 인삼 질소화합물의 생화학 및 약리학적 효능에 관한 연구는 상대적으로 다른 성분의 연구보다 비교적 적은 실정이다. 그 이유는 성분을 분리하는데 어려움이 있고 분리한 화합물의 생리적 활성조사가 매우 제한적이기 때문이라 생각한다. 이러한 점을 감안하여 고려수삼 단백질의 분포와 전기영동상의 패턴변화 연구를 수행하였고,[22] 그 결과 미국삼과 고려수삼에서 차이를 보이는 단백질 즉, GMP를 고려수삼으로부터 분리하여 이들의 물리화학적 특성 및 생리활성을 탐색하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 1996년 10월 한국인삼연초연구원에서 수확한 6년근 수삼이었다. 포장에서 수확한 신선한 인삼을 껍질을 벗기지 않고 2차 증류수로 세척하고 상온에서 물기를 제거한 후, -70℃ 냉동고에 보관하여 실험재료로 사용하였다.

고려인삼 GMP의 분리·정제

시료 300 g 주피부분을 오려낸 뒤 중심부분을 약 1 cm 크기로 잘게 썰은 다음, buffer A(50 mM Tris-HCl, pH 8.5 0.01% NaN_3)와 함께 Waring blender를 이용하여 분쇄하였다. 이하 모든 과정은 특별히 온도에 관한 기술이 없는 한 4℃에서 수행 하였으며, 단백질의 용출은 280 nm에서의 흡광도로 측정하였고, 각 단계별 단백질의 순도는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 통하여 확인하였다. 분쇄한 homogenate를 cheese cloth로 1차 여과하고 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 단백질 분리에 사용하였다. 이 상등액을 ammonium sulfate 25~80% 포화 농도에서 분리한 다음, 원심분리에 의해 침전된 단백질을 1 ml buffer A에 용해시키고 투석을 하여 탈염하였다. 이 농축액을 microfiber filter로 여과한 후

찾는말 : 단백질 분리정제, 고려인삼, 항보체활성
*연락저자

Bio-Gel P-100 column(3×33 cm)으로 major fraction 을 얻어(GMP 분획), DEAE sepharose CL-6B column(2.6×20 cm)을 사용하여 0-1M NaCl 직선 농도구배로 분리하였다. GMP 분획을 다시 0.05% Trifluoroacetic acid(TFA) 용액으로 투석한 뒤 resource RPC column(3 m*l*)을 이용하여 TFA 용액 0.05~0.065% 직선 농도구배로 분획하였다. GMP 분획을 모은 다음, 50 mM Tris-HCl(pH 8.5) 용액으로 투석한 다음, resource Q(1 m*l*)를 이용 NaCl gradient로 재분리하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량분석은 Bradford의 방법[23]에 따라 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 시행하였다. 표준 단백질은 bovine serum albumin을 사용하여 linear range(0~5 μg)에서 595 nm의 흡광도에서 분석하였다.

분자량 측정

정제 단백질의 subunit 분자량은 12.5% SDS-PAGE로 측정하였다. 분자량 측정에 사용된 표준 단백질은 bovine serum albumin(Mw 66,200), ovalbumin(Mw 45,000), carbonic anhydrase(Mw 31,000), trypsin inhibitor(Mw 21,500), lysozyme (Mw 14,400)들 이었다. Native form의 분자량은 Pharmacia Superdex 75 FPLC로 측정하였고, 이 때 사용된 표준 단백질은 bovine serum albumin(Mw 67,000), ovalbumin(Mw 43,000), chymotrypsinogen A(Mw 25,000), ribonuclease A (Mw 13,700)과 blue dextran 2000(Mw 2,000,000) 이었다.

PAS(periodic acid-Schiff) 염색24)

SDS-PAGE를 실시한 후, gel을 5% phosphotungstic acid 용액으로 90분, 7%(v/v) methanol, 14%(v/v) acetic acid 용액, 1% periodic acid 용액, 0.5% sodium metabisulfite 용액으로 각각 1시간 동안 반응시킨 후 Schiff's reagent로 염색하였다.

항보체 활성도 측정[25,26]

양 적혈구 또는 토끼 적혈구 희석액 40 μ*l*에 160 μ*l*의 증류수를 가하여 완전히 용혈되게 한 후, 0~100%로 희석하여 405 nm 또는 540 nm에서 적혈구 용혈액 농도와 흡광도 상관관계를 조사하였다. 이를 기준으로 보체 결합반응을 3회반복으로 진행하여 측정한 흡광도를 환산하여 각 실험구의 용혈율(% hemolysis)을 계산하였다. 이 실험에서는 표준용혈 조건과 동일한 농도로 감작적혈구를 증류수로 용혈한 실험구와 56°C에서 30 분간 정치하여 불활성화된 보체 실험구를 함께 측정하여 각각 최대 및 최저 용혈값으로 하였다. 시료 감정시 감작적혈구 대신에 동량의 GVB용액 (Gelatin Veronal Buffer; 1.8 mM sodium barbital, 3.1 mM barbituric acid, 0.141 M NaCl, 0.1% gelatin and 0.3% sodium azide, pH 7.3)을 넣은 실험구를 추가하여 시료 색소에 의한 흡광도를 보정하였다.

결과 및 고찰

고려인삼 GMP의 분리 및 정제

Bio-gel P-100을 이용한 gel filtration chromatography에서 유출된 major peak을 모아 DEAE sepharose CL-6B column에 0~1 M NaCl 직선 농도구배를 사용하여 분획하였다. 그 결과 3개의 단백질 peak를 발견할 수 있었으며 고려인삼 GMP는 약 0.8 M에서 용출되었다.[22] GMP 분획의 SDS-PAGE 수행 결과, 66 kDa부위의 단백질이 많이 제거되었음을 알 수 있었다. GMP 분획을 모아 다시 Resource RPC FPLC를 통해 분리하여 2개의 단백질 peak를 얻었으며(Fig. 1), 이 중 가장 큰 peak에서 GMP를 발견하였다. 특히 66 kDa 단백질은 제거하기 힘든 단백질이었는데 RPC column을 통해 완전히 제거되었음을 알 수 있었다. 20 kDa이하의 단백질을 제거하기 위해서 resource Q(1 m*l*)를 이용하여 GMP 분획을 분리한 후 SDS-PAGE로 분석해본 결과(Fig. 2), 최종적으로 20 kDa이하의 단백질로부터 GMP를 분리해 낼 수 있었다. GMP는 SDS-PAGE를 이용한 분자량 측정결과, 약 25 kDa으로 판명되었으며, 이는 기발표된[22] 27 kDa보다 2 kDa이 작은 것으로 확인되었다. 또한 GMP는 native form이 66 kDa 분자량의 oligomer로 간주되었으나, 순수분리 결과 66 kDa 분자량의 단백질은 GMP의 native form이 아닌 다른 단백질임이 확인되었다. 표준 단백질을 이용한 FPLC superdex 75로 부터 GMP의 native form은 약 63 kDa의 분자량을 갖는 dimer로 판단되었다(이하 기술). 그러나 GMP는 SDS-PAGE 상에서 순수분리되지 않았고 항상 두 개의 밴드가 같이 나타났다.

Reducing condition에 따른 변화

앞서 기술한 바와 같이 FPLC로 분리된 GMP는 reducing SDS-PAGE 상에서 두 개의 단백질 밴드로 나타나지만, non-reducing 조건에서는 높은 분자량의 밴드가 낮은 분자량으로 이동할 뿐만 아니라 GMP와 같은 single band로 존재한다.[22] 두 개의 단백질 밴드가 non-reducing 조건에서 한 개의 단백질 밴드로 변화하는 것은 아마도 두 단백질이 isoform

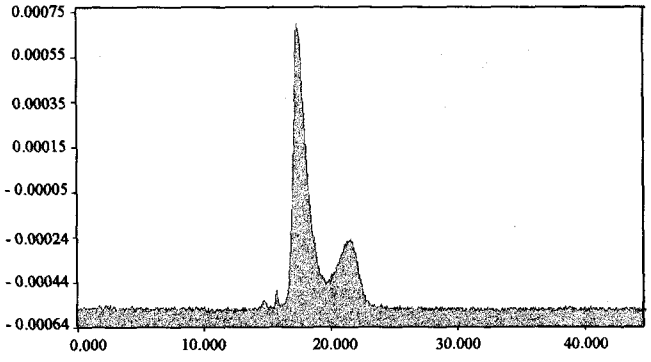

Fig. 1. Resource RPC FPLC chromatogram of the ginseng major protein fractions. Starting buffer: 0.05% TFA in water, elution buffer: 0.065% TFA in acetonitrile and flow rate: 0.5 m*l*/min.

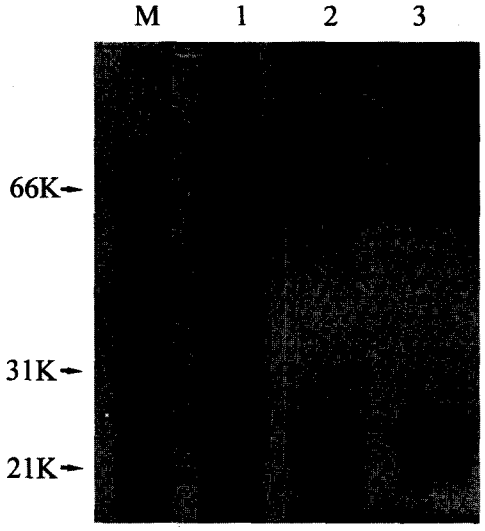

Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel analysis of the purification of the ginseng major protein. Lane M: molecular weight markers, Lane 1: crude extract; Lane 2: after resource RPC FPLC, Lane 3: after resource Q FPLC.

의 관계를 갖는 경우이거나 시료내에서 혹은 단백질 분리 과정에서 GMP 단백질에 화학적 변화가 일어난 결과로 추정된다. 더욱이 N-terminal seuquencing 결과 동일한 아미노산 서열을 보여줌에 따라, 두 단백질은 같은 단백질에서 출발한 것으로 보인다. 이들 두 단백질은 1) 인삼뿌리에서 존재하는 isoform 단백질의 가능성, 2) 25 kDa GMP와 C-terminal이 truncated된 변형된 GMP일 가능성, 3) GMP에 post-translational modification이 일어났을 가능성, 4) 단백질 분리정제 과정 조건에서 인공적으로 생성되었을 가능성 등이 예상된다. 현재 이들 두 단백질은 Mono P FPLC를 사용하여 분리가능한 것으로 확인되고 있으며, 아미노산 서열 측정을 계속 수행 중이다.

PAS(periodic acid-Schiff) 염색

1% periodic acid를 사용하여 단백질에 결합되어 있는 oligosaccharide를 산화시킨 다음 Schiff's reagent로 염색하는 방법을 사용하였을 때, 고려인삼 GMP에 있어서 매우 효과적인 염색 방법임이 확인되었다. 그러나 분홍색 염색밴드가 gel 상에서 영구적으로 지속되지 못하는 단점이 있었고, Schiff's reagent로 염색을 할 때 암실에서 최소 24시간이 소요되었다. 이 방법에 따라 GMP 두 개의 단백질 밴드가 동시에 분홍색을 보임으로써 같은 단백질 부위에 당이 결합되어 있다고 판단되었다. 또한 glycosidase를 이용한 gel 상에서의 band shift 현상을 관찰함으로써 GMP는 glycosidase에 분해되는 결합을 갖는 탄수화물과 complex를 이루는 당단백질임을 확인하였다(data not shown). 뿐만 아니라 glycosidase 분해효소 처리 후 두 개의 단백질 band가 동시에 shift되는 것으로 보아 아마도 탄수화물 구성서열에 있어서 두 단백질은 같은 것으로 사료된다. 따라서 SDS-PAGE 상에서 나타나는 두 개의 단백질 밴드는 같은 단백질에서 출발한 것임을 보여주고 있다.

항보체 활성

고려인삼 주요단백질의 농도를 60, 100, 200, 400 μg/ml으로 한 결과 400 μg/ml로 처리한 실험구에서 86.6%의 저해효과를 보였다(Table 1). 항보체활성은 control로 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 사용하였으며 control에 비해 유의적인 활성화를 보여주었다. 활성 측정시 홍삼에서 추출한 분획들도 검증하였는데 홍삼 분획에 비하면 활성이 낮지만 다른 대부분의 홍삼 추출물 분획과 비교하였을 때, 고려수삼 GMP는 비교적 높은 항보체활성을 보였다. 그러나 GMP의 탄수화물 부분이 독자적으로 항보체 활성에 기여할 가능성을 배제할 수 없으므로 고려인삼 주요단백질의 당들을 분해시켜서 당과 단백질 부위의 활성을 각각 측정해보아야 할 것으로 생각된다. 또한 당가수분해 효소들을 각각 처리한 다음 밴드의 이동정도 또는 immunoblotting을 통해서 단백질에 결합되어 있는 당의 종류를 규명할 수 있으리라 본다.

GMP의 분리정제는 최종적으로 chromatofocusing을 수행하였을 때 이웃하고 있는 두 개의 단백질 밴드가 서로 분리되는 것이 관찰되고 있다. 여러 가지 방법을 이용하여 두 단백질의 특성연구를 진행 중이며, 앞서 기술한 바와 같이 두 단백질의 N-terminal 아미노산 서열이 같기 때문에 인삼 뿌리세포내에 존재하는 isoform 단백질의 가능성, 혹은 post-translational modification이 일어났을 가능성 외에도 단백질 분리정제 과정 중에 변형되었을 가능성도 배제하지 않고 있다. GMP 단백질 분리정제에 있어서 유사한 두 단백질을 분리하는데 기술적 어려움에도 불구하고 현재 GMP의 N-terminal sequencing 실험으로부터 약 15개 아미노산의 서열을 확보해 놓고 있으며, 단백질 database를 통한 아미노산 서열 similarity를 확인한 결과 이제까지 알려진 단백질과의 유사성을 찾지 못하고 있다. 아마도 아직까지 밝혀지지 않은 전혀 다른 단백질일 가능성도 있겠지만, 가수분해를 통한 펩타이드의 아미노산 서열이 가능해지면 좀 더 확실한 정보를 얻을 수 있으리라 사료된다.

항보체 활성 외에도 항산화성과 항암성 등에도 유의성 있는 결과가 본 연구실에서 확인되고 있다. 앞으로 GMP가 가수분해되어 생성되는 펩타이드 분획들에 대한 활성검증 실험과 분리를 통해서 좀더 개량된 활성 펩타이드의 개발이 가능하리라 보며, 또한 진행 중인 탄수화물 부위의 분석 실험이 완료되면 탄수화물과의 상호작용에 대한 정보를 얻을 수 있으리라 본다. GMP가 갖고 있는 또하나의 특성, 즉 많은 가수분해 효소에 대해 resistant한 점에 탄수화물 부위가 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 생리활성 연구로

Table 1. Anticomplementary activities of the 25 kDa major protein from *Panax ginseng* C. A. Meyer.

Test sample (μg/ml)	O.D.	S.D.*	Inhibition (%)	S.D.(%)*
400	0.132	0.019	86.6	1.9
200	0.540	0.009	10.5	1.4
100	0.498	0.018	2.1	3.2
60	0.494	0.016	-1.7	3.3

*S.D.: standard deviation

나터 얻은 결과는 앞으로 분리되는 단백질 및 기타성분의 나자수준의 기작연구에 좋은 영향을 미치리라 예상된다.

감사의 글

본 연구는 1998년 농림수산부 농업기술개발 첨단연구과 ‖ (과제번호 296012-3) 수행 결과의 일부이며, 이에 감사 :린다. 또한 한국 인삼연초연구원 유전생리 3실 연구원의 :움에 감사드린다.

참고문헌

1. Garriques, S.S. (1854) *Ann. Chem. Pharm.* **90**, 231.
2. Brekhman, I.I. (1957) *Gosudarst lsdat et Med. Lit. Leningrad.* 1-181.
3. Iwabuchi, H., Yoshikura, M. and Kamisako, W. (1988) *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2447.
4. Kim, S.I., Kang, K.S. and Lee, Y.H. (1989) *Arch. Pharm. Res.* **12**, 48.
5. Wee, J.J., Park, J.D. and Kim, M.W. (1990) *Korean J. Ginseng Sci.* **14**, 27.
6. Park, J.D., Wee, J.J., Kim, M.W. and Yoo, S.J. (1987) *Arch. Pharm. Res.* **10**, 197.
7. Tomoda, M., Shimada, K., Konno, C., Sugiyama, K. and Hikino, H. (1984) *Planta Medica* **50**, 436.
8. Gstirner, F. and Vigt, H.J. (1966) *Arch. Pharm.* **299**, 934.
9. Hiyama, C., Miyai, S., Yoshida, H., Yamasaki, K. and Tanaka, O. (1987) *Yakugaku Zasshi* **98**, 1132.
10. Kim, M.W., Cho, Y.H. and Cho, K.J. (1981) *Annual report of Korean Ginseng* p.376.
11. Kim, M.W. (1981) *Annual report of Korean Ginseng* p.353.
12. Lee, C.H., Nam, K.Y. and Choi, K.J. (1978) *Korean J. Food Sci. Technol.* **10**, 263.
13. Cho, Y.D., Kim, T.U. and Choi, H.G. (1981) *Korean J. Ginseng Sci.* **5**(1), 65.
14. The Korean Ginseng and Tobacco Research Institute (1985) *Korean Ginseng Efficacy* p.19-22.
15. Ranje C. and Ungerstedt U. (1977) *Brain Res.* **134**, 95-111.
16. Ohta, T., Yamamoto, K.F., Zong, Z., Yamazaki, M., Odashima, S., Kitagawa, I., Abe, H. and Arichi, S. (1987) *Cancer Research,* **47**, 3863.
17. Shin, J.G., Park, J.W., Pyo, J.K., Kim, M.S. and Chung, M. H. (1990) *Korean Ginseng Sci.* **14**, 187.
18. Park, K.H., Nam, K.Y., Park, H.J., Park, J.K., Hyun, H.C., Park, K.M., Lee, M.H., and Kyung, C.S. (1992) *Annual report of Korean Ginseng* (Efficacy & Production) p.5.
19. Lee, K.S. et al. (1992) *Annual report of Korean Ginseng* (Efficacy & Production) p.255.
20. Okuda, H., Lee, S.D., Matsuura, Y., Zheng, Y., Sekiya, K., Takaku, T., Kameda, K., Hirose, K., Ohtani, K., Tanaka, O. and Sakata, T. (1990) *Proceedings of International Symposium of Korean ginseng* p.15, The society for Korean Ginseng.
21. Park, H., Lee, M.K. and Lee, C.H. (1987) *Proc. Int. Sym. on Ginseng Res. Life Medical Res. Inst. Taichung,* R. O. C. p. 242-268.
22. Park, H., Kwon, T.H. and Kim, K.H. (1996) *Korean J. Ginseng Sci.* **20**(1), 49-53.
23. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
24. Doener K.C. and White B.A. (1990) *Anal. Biochem.* **187**(1), 147-150.
25. Kabat, E.A. and Meyer, M.M. (1961) *Experimental Immunochemistry 2nd ed. Charles and Thomas. USA.*
26. Oh, S.R., K.Y. Jung and H.K. Lee (1996) *Agr. Chem. Biotech.* **39**, 147-152.

Purification of a major protein with physiological activities from *Panax ginseng* C. A. Meyer

Taek H. Kwon, Sei R. Oh[1], H. Park[2], and Kyung H. Kim*(*Graduate School of Biotechnology, Korea University, An-am dong, Sung-buk gu, Seoul,* [1]*Laboratory of Natural Product Biosynthesis, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yu-sung gu, Daejon.* [2]*Division of Genetics and Physiology, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Science Town, Taejon*)

Abstract : The major protein (GMP) from the roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer was purified, using gel filtration and ion exchange chromatography followed by reversed-phase and ion exchange FPLC. Staining analysis indicated that the protein has a carbohydrate moiety, which was also shown by band shift experiments using various glycosidases. Electrophoretic and gel permeation studies showed that GMP has an apparent molecular weight of 63 kDa composed of possibly two subunits of 25 kDa containing carbohydrate moiety. GMP showed an anticomplementary activity on the hemolysis of red blood cells, which is a screening tool for inflammation mediator search.

Key words : *Panax ginseng*, protein, anticomplementary activity

*Corresponding author