

황금 배양 세포로부터 Phospholipase A₂의 분리

마충제* · 김대경¹

강원대학교 생명공학부, ¹중앙대학교 약학대학

Purification of Phospholipase A₂ from *Scutellaria baicalensis* Suspension Cells

Choong Je Ma* and Dae Kyung Kim¹

Department of Biomaterials Engineering, School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

¹College of Pharmacy, Chungang University, Seoul 156-756, Republic of Korea

Abstract – It was previously reported that yeast elicitor transiently increased oleanolic acid and ursolic acid in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures and also doubled phospholipase A₂ (PLA₂) activity. Thus, PLA₂ was purified from the soluble fractions of *S. baicalensis* suspension cultures and the characters of the purified PLA₂ were identified. The PLA₂ was purified about 160 times compared with the starting soluble-protein extract from *S. baicalensis* suspension culture cells. The purified protein showed a molecular mass of about 43 kDa by SDS-PAGE. The purified plant PLA₂ had a neutral pH optimum (pH 7.0) and required Ca²⁺ for activity. The PLA₂ activity was inhibited by mammalian PLA₂ inhibitors such as 5,8,11,14-eicosatetraynoic acid (ETYA) and arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃).

Key words – arachidonyl trifluoromethyl ketone, 5,8,11,14-eicosatetraynoic acid, phospholipase A₂, *Scutellaria baicalensis*

포스포리파아제 A₂ (PLA₂)는 당인지질의 sn-2 이스터 결합을 분해하고, 친-염증 과정에서 가장 중요한 역할을 하여 염증에 의한 질환에 영향을 주는 효소이다.¹⁾ 동물에서는 PLA₂에 의한 세포막의 인지질의 분해로 인해 생성된 아라키돈산이 연속적으로 대사되어 프로스타글란딘, 트롬복산, 류코트리엔과 같은 eicosanoid류를 생합성 하는 것으로 알려져 있다.²⁾

그러나, 식물에서 PLA₂가 다양한 식물의 신호 전달체계에 영향을 있을 것이라는 간접적인 증거들은 있지만 실제로 PLA₂를 분리 정제하여 성격을 규명하는 연구는 많이 진행되어 있지 않다.

식물 세포에서 세포막으로부터 유리된 linolenic acid는 동물세포에서 arachidonic acid와 유사한 역할을 하는 것으로 보고가 되고 있다. 즉, linolenic acid는 jasmonic acid와 다른 octadecanoid로부터 유래한 식물 성장 조절 물질의 전구체로 추정되고 있다.^{3,4)} Jasmonic acid 및 octadecanoid 유래 물질은 강력하고 다양한 활성이 있는 식물 성장 조절 물질

로서 수술의 개열, 열매의 성숙, 뿌리의 생장, 덩굴손의 비틀림 등을 조절하고, 식물이 곤충이나 병원균에 저항성을 갖게 하는 데에 매우 중요한 역할을 한다.⁵⁾ 가지과 식물인 고추 (*Capsicum annuum* L.)의 배양세포에 cellulase, yeast extract와 같은 생물학적 elicitor를 가하면 sesquiterpene계열 물질인 capsidiol의 생성이 증가하는데 이 과정에 PLA₂의 활성화가 중요한 역할을 한다는 보고가 있다.⁶⁾ 이러한 결과들을 통하여, 식물에 존재하는 PLA₂에 의한 linolenic acid의 유리가 동물세포에서 아라키돈산-프로스타글란딘 시스템의 경우에서처럼 식물의 신호 전달체계에서 속도 결정 단계라고 생각할 수 있다.^{7,8)}

지난 연구에서 황금배양세포에 yeast elicitor를 처리하여 triterpenoid의 생성이 증가함을 확인하였고, 이러한 이차 대사산물 생합성의 증가는 PLA₂의 활성화로 인한 jasmonic acid에 생성에 의해 조절됨을 보고 하였다.⁹⁾

본 연구에서는, 황금 배양세포로부터 PLA₂를 분리 정제하고, 그 성격을 규명하고자 하였다. 황금 배양세포로부터 분리한 PLA₂의 기질 특이성을 조사하여 PLA₂와 jasmonic acid의 생합성 간의 상관관계도 확인하고자 하였다.

*교신저자 (E-mail): cjma@kangwon.ac.kr
(Tel): 82-33-250-6565

재료 및 방법

시약 및 재료 - 1-Stearoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl-GPC (55.3 mCi/mmol)는 Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK)로부터 구입하였다. 1-Stearoyl-2-arachidonyl-*sn*-glycerol, arachidonic acid (AA), 1-stearoyl-2-arachidonoyl-GPC, ETYA 등은 Sigma (St. Louis)에서 구입하였다. Lyso-phosphocholine 은 AvantiPolar Lipids (Alabaster, AL)로부터 구입하였고, arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃)는 Biomol (Plymouth Meeting, PA)에서 구입하였다. 다른 시약들은 가능한 특급 시약을 구매하여 사용하였다.

PLA₂ 활성 측정 - PLA₂의 활성은 2-[1-¹⁴C]AA-GPC를 기질로 사용하여 Jung과 Kim의 방법을 변형하여 측정하였다. 요약하면, 75mM Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]-HCl (pH 7.0), 3mM CaCl₂, 0.1% (w/v) sodium deoxycholate (SDC), 4.5nmol의 radioactive phospholipids (approximately 55,000 cpm)의 100 mL 용액을 37°C에서 30분간 반응시켰다. Dole의 방법 (*n*-heptane:isopropyl alcohol:1N H₂SO₄; 400:390:10, v/v)을 이용하여 반응을 종결시키고 원심분리하였다.¹⁰⁾ 상등액 150 mL를 취하여 마이크로튜브에 옮겨 담고 *n*-heptane 800 mL와 silica gel (약 6 mg)을 가하였다. 시료를 vortex로 섞고 원심분리하여 상등액 (750 mL)을 2.5 mL의 scintillation solution에 넣고 Packard Tri-carb liquid β-scintillation counter에서 활성을 측정하였다.¹¹⁾

황금배양세포로부터 PLA₂의 분리 - 황금 현탁 배양 세포는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (0.5 mg/l), kinetin (0.1 mg/l), *p*-chlorophenoxyacetic acid (2 mg/l) and sucrose (30 g/l)를 포함하는 SH liquid medium (pH 5.8) 125 ml에 2 g의 캘루스를 분산시켜 확립하였다. 2주마다 계대 배양하였으며 25°C의 회전 배양기에서 100 rpm으로 회전하며 배양하였다. 황금배양세포 300 g을 수확하여 buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 3 mM EDTA, 0.12M NaCl, 2 mM DTT)로 수 회 씻어 주었다. 800 ml의 buffer A를 가지고 블랜더를 이용하여 homogenize하였다 (model Polytron PT 6000, Kinematica AG, Littau, Switzerland). 3,000 g, 4°C에서 30 분 동안 원심분리 한 후 상등액을 취하였다. 상등액을 100,000g, 4°C에서 60분 동안 원심분리하여 다시 상등액을 취하여 단백질 분리 시료로 사용하였다. 염을 제거하기 위하여 상등액에 2.5M (NH₄)₂SO₄를 가하고 4°C에서 2 시간 동안 저어 준 후 10,000 g, 4°C에서 30 분 동안 원심분리하였다. 침전을 200 ml의 buffer A로 재현탁시켜 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. Buffer B (1 mM EDTA을 포함한 pH 7.5의 50 mM Tris-HCl)로 평형화된 DE52 anion exchange column (21.5 mm×15 cm, Tosoh)에 단백질을 주입하였다 (flow rate : 10.0 ml/min). 컬럼을 buffer B로 씻어준 다음 수지에 결합한 단백질은 buffer C (1 mM

EDTA, 1N NaCl을 포함한 50 mM Tris-HCl)로 용출시켰다. 활성을 측정 후 활성이 강한 분획 (40 ml)을 합하여 buffer B로 평형화된DEAE-5PW column (7.5 mm×7.5 cm, Tosoh)으로 분리하고자 하였다. 0.0N에서 1.0N의 NaCl의 농도구배를 통해 활성 분획 (15 ml)을 얻었다. 1 mM EDTA, 0.5M (NH₄)₂SO₄를 포함한50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 평형화된 Phenyl-5PW column (5.0 mm×5.0 cm, Tosoh)으로 PLA₂활성 분획을 분리하였다. 0.5M에서0.0M의 (NH₄)₂SO₄ 농도구배를 통하여 5 ml의 활성분획을 얻었고, 이를 Centricon 10 (Amicon, Beverly, MA)을 이용하여 300 ml로 농축하였다. 마지막으로, 0.1N NaCl, 1mM EDTA를 포함하고 있는 pH 7.5인 50 mM Tris-HCl buffer로 평형화된 Superose 12 gel filtration FPLC column (10 mm×30 cm, Pharmacia LKB)을 사용하여 동일한 buffer로 PLA₂를 분리하였다.

Protein assay - PLA₂를 분리하는 동안 단백질의 양을 측정하기 위해 UV검출기를 사용하여 280 nm에서 측정하였다. 각 시료의 단백질의 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준물질로 하여 Bradford 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 측정하였다.

SDS-PAGE - Superose 12 FPLC column으로부터 얻은 활성 분획 각 20 ml를 Laemmli의 sample buffer (0.125M Tris-HCl, pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromphenol blue)에 넣고 혼합한 후 95°C에서 5 분 동안 반응시켰다. 시료를 상온에서 냉각시킨 후 Laemmli의 방법을 이용하여 12% (w/v) PAGE로 단백질을 확인하였다.¹²⁾ 분리된 단백질은 Plus-One silver staining kit (Pharmacia LKB)를 사용하여 염색하였다.

분리한 PLA₂의 특성 분석 - 분리한 PLA₂의 성격을 규명하기 위해 Superose 12 gel filtration column의 활성 분획을 모아서 PD-10 desalting column (Sephadex G-25M, Pharmacia LKB)을 이용하여 염을 제거하였다. 몇몇 실험에서, PLA₂와 적정량의 PLA₂ 활성 억제제를 혼합하여 37°C에서 10분간 전처리 하였다. pH와 칼슘이온의 농도가 PLA₂의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH와 칼슘이온의 농도에 변화를 주며 PLA₂의 활성을 비교하였다.

결과 및 고찰

황금 (*S. baicalensis*) 배양세포로부터 phospholipase A₂ (PLA₂)를 분리 정제한 결과를 Table 1에 요약하여 나타내었다. 분리한 PLA₂의 수율은 0.13%였고, 황금 배양세포 균질액에 비해 비활성도는 160배 증가하였다 (Table 1). 조효소액을 ammonium sulfate, DE52 anion exchange, DEAE-5PW anion exchange, Phenyl-5PW hydrophobic, Superose 12 gel-filtration column chromatography에 의해 PLA₂를 분

Table I. Summary of purification of the 43 kDa cytosolic PLA₂ from *S. baicalensis* suspension cells. Sequential steps used in purification of the plant PLA₂, resulting in a 160-fold purification with 0.13% recovery

Step	Protein	Total activity	Specific activity	Purification	Yield
	mg	pmol/min	pmol/min/mg	fold	%
Lysate	534.64	9,622	18	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	202.30	8,825	44	2.4	91.72
DE52	18.60	5,167	278	15.4	53.70
DEAE-5PW	0.73	2,055	2,819	156.6	21.36
Phenyl-PW	0.03	119	3,982	221.2	1.24
Superose 12	0.0045	13	2,867	159.3	0.13

리 정제하였다. 효소 균질액에 ammonium sulfate를 가하여 침전을 생성하였고, 이 과정에서 91.72%의 수율과 2배의 순도 증가를 확인하였다. 또한, 이 과정을 통하여 효소 균질액의 저분자 노랑 색소 물질이 제거되어 투명한 조효소액을 얻을 수 있었다. 투명한 조효소액을 DE52 음이온 교환 HPLC 컬럼에 적용하여 효소 균질액에 비하여 순도가 15배 증가한 PLA₂ 분획을 얻었다. 이렇게 분리된 효소액은 상온에서는 다소 불안정 하였으나 -70°C에서 수 주 동안 안정하였다. DEAE-5PW anion exchange HPLC column을 통하여 150배 순도가 증가한 활성 분획을 얻었다. 보다 순수한 PLA₂를 분리하기 위하여 계속하여 소수성 Phenyl-5PW 컬럼에 활성분획을 주입하고, 0.5에서 0.0M의 (NH₄)₂SO₄ 농도 구배를 통하여 순도가 220 배 증가한 활성분획을 얻었다. 마지막으로, Superose 12 gel-filtration HPLC 를 통하여 얻은 활성 분획의 순도는 160배 증가하였고 수율은 0.13% 이었다. 이 과정에서 비활성도 및 순도가 감소하였는데, Phenyl-5PW HPLC로부터 얻은 활성분획을 농축하는 과정에서 효소의 활성이 감소한 것으로 추정된다. PLA₂의 활성이 가장 높은 피크는 약 45 kDa에 해당하였고, 활성 분획을 수집하여 12% SDS-PAGE에 전개하였을 때 43 kDa의 분자량을 가지는 밴드로 분자량을 확인할 수 있었으며, Fig. 1에서 보는 바와 같이 용출 크로마토그램과 PLA₂ 활성 간에 강한 연관관계를 확인할 수 있었다.

pH가 황금 배양세포로부터 분리한 PLA₂의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Superose 12 gel-filtration column chromatography에서 분리한 활성 분획을 pH 4.5~11.0의 범위 사이에서 활성 정도를 비교하였다. 많은 경우에, 동물세포에서 분리한 PLA₂는 비교적 넓은 범위의 pH에서 활성을 나타내었고, 염기 pH (pH 8~9)에서 강력한 활성을 나타내었다.¹³⁾ 그러나, 황금 배양 세포에서 분리한 PLA₂는 pH 7의 아주 좁은 중성 범위의 pH에서 최적 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

PLA₂의 기질 선호도를 확인하기 위하여 2-[1-¹⁴C]linoleoyl-

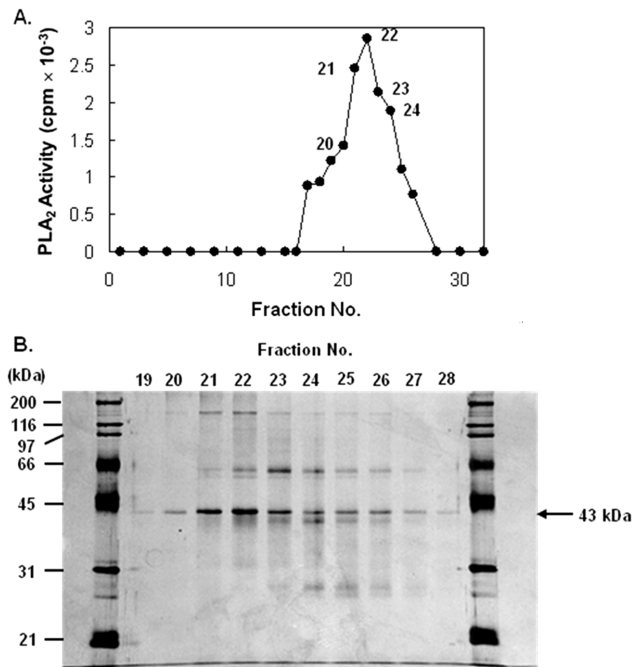


Fig. 1. A. Gel filtration column chromatography on Superose 12 FPLC. The active fractions obtained from Phenyl-5PW column were applied to a Superose 12 gel filtration column. B. The active fractions from Superose 12 gel filtration FPLC columns were analyzed by 12% (w/v) SDS-PAGE and visualized by silver stain. The standard protein markers were as follows: myosin (200 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), and trypsin inhibitor (21 kDa). The molecular mass (arrow) of the plant PLA₂ was extrapolated from R_f value.

sn-glycero-3-PC (2-[1-¹⁴C]LE-PC)와 2-[1-¹⁴C]linolenoyl-*sn*-glycero-3-PC (2-[1-¹⁴C]LEN-PC)를 각각 기질로 하여 PLA₂의 활성 정도를 비교하였다. Fig. 3에서 보는 것과 같이, 황금의 PLA₂는 2-[1-¹⁴C]LEN-PC를 기질로 하였을 때 2-[1-

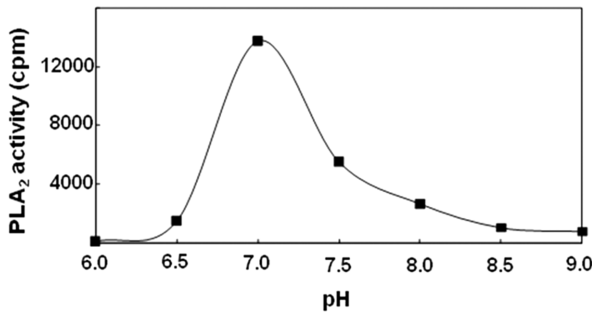


Fig. 2. Effects of pH on the plant PLA₂ activity. The PLA₂ activity was assayed in the range of pH 6.0 to 9.0. The pH buffers were as follows: imidazol-HCl, pH 6.0 to 6.5; Tris-HCl, pH 7.0 to 9.0.

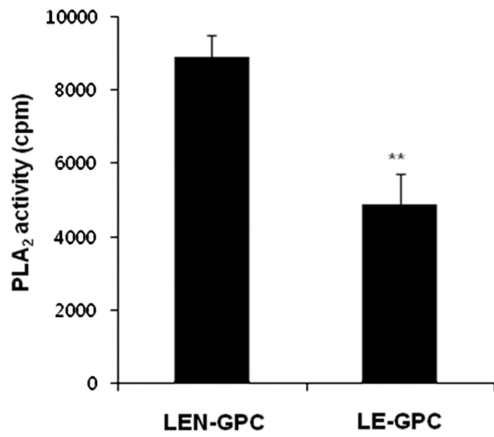


Fig. 3. Substrate specificity for the purified 43 KDa plant PLA₂. An aliquot of the active pool obtained from the Superose 12 gel filtration HPLC column was assayed for the PLA₂ activity with 25 μ M of the indicated substrates.

¹⁴C]LE-PC를 기질로 하였을 때보다 활성이 약 2배 정도 강하게 나타났다. 식물 세포에서 세포막으로부터 유리된 linolenic acid는 동물세포에서 arachidonic acid와 유사한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 다시 말하면, linolenic acid는 jasmonic acid와 다른 octadecanoid로부터 유래한 식물 성장 조절 물질의 전구체로 추정되고 있다.⁴⁾ 이러한 결과는 황금에서 분리한 PLA₂가 세포막의 인지질로부터 jasmonic acid의 전구체로 알려진 linolenic acid의 생성에 관여함을 시사한다.

5,8,11,14-eicosatetraynoic acid (ETYA), arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃)와 같은 다양한 PLA₂의 억제제가 분리한 PLA₂의 활성에 미치는 영향을 측정하였다. ETYA는 동물세포 PLA₂의 억제제로 auxin에 의한 식물의 성장을 차단한다는 보고가 있다.¹⁴⁾ Fig. 4에서 나타난 것과 같이, ETYA는 황금에서 분리한 PLA₂에 대하여 농도의존적으로 유의성 있는 억제 활성을 나타내었다. Arachidonic

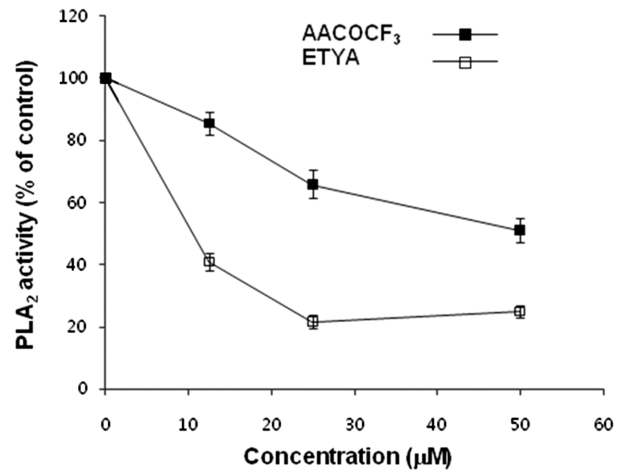


Fig. 4. Effects of the various mammalian PLA₂ inhibitors on the plant PLA₂ activity. The plant PLA₂ obtained from the Superose 12 gel filtration was pre-incubated with the indicated concentration of mammalian PLA₂ inhibitors for 10 min followed by assaying the PLA₂ activity.

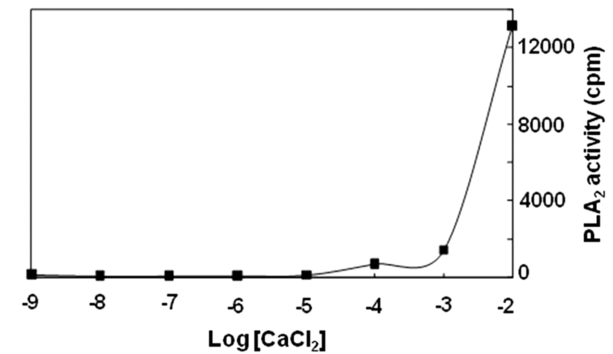


Fig. 5. Effects of calcium on the plant PLA₂ activity. The PLA₂ obtained from Superose 12 gel filtration column was assayed in the presence of various concentration of CaCl₂.

acid의 trifluoromethyl ketone analog인 AACOCF₃는 그룹 IV cPLA₂와 iPLA₂의 억제제로 알려져 있다.^{15,16)} AACOCF₃ 또한 농도 의존적으로 유의성 있는 PLA₂ 활성 저해를 나타내었다 (Fig. 4).

칼슘이온 농도가 정제된 효소 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 칼슘 이온은 동물 PLA₂의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 세포막에서 cPLA₂의 활성화를 촉발시켜 PLA₂의 촉매작용을 매개하는 인자로 작용한다고 알려져 있다.¹¹⁾ 황금에서 분리한 식물 PLA₂의 활성을 10⁻⁹ M에서 10⁻² M 농도 범위의 CaCl₂의 존재 하에 비교하였다. PLA₂의 활성은 Ca²⁺의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 5). 이러한 결과는 황금에서 분리한 43 kDa의 식물 PLA₂는 칼슘이 활성화에 필수적인 칼슘 의존형임을 시사한다.

본 연구를 통하여 황금의 배양세포로부터 칼슘에 의해 활성화되고, ETYA와 AACOCF₃와 같은 PLA₂ 억제제에 의하여 활성이 저하되는 분자량 43 kDa인 PLA₂를 분리 정제하였고, 분리한 식물 PLA₂는 세포막으로부터 jasmonic acid의 전구체로 알려진 linolenic acid을 유리시켜 다양한 식물의 방어 기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 이전에 보고했던 황금배양세포에서 elicitation에 의한 triterpenoid의 생성 증가 및 PLA₂의 활성의 증가와 함께 황금 배양세포로부터 PLA₂를 분리하고 특성을 규명한 본 연구 결과가 terpenoid의 생성량이 증가된 생리활성이 뛰어난 황금 배양세포의 개발에 충분히 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 일부 2008년도 강원대학교 학술연구조성비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Divchev, D. and Schieffer, B. (2008) The secretory phospholipase A₂ group IIA: a missing link between inflammation, activated rennin-angiotensin system and atherogenesis? *Vascul. Health Risk Manag.* **4**: 597-604.
- Dennis, E. A., Rhee, S. G., Billah, M. M. and Hannun, Y. A. (1991) Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* **5**: 2068-2077.
- Bergey, D. R., Howe, G. A. and Ryan, C. A. (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12053-12058.
- Creelman, R. A. and Mullet, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 355-381.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. and Okada, K. (2001) The defective in anther dehiscence 1 gene encodes a novel phospholipase A₁ catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 2191-2209.
- Ma, C. J. (2008) Cellulase elicitor induced accumulation of capsidiol in *Capsicum annum* L. suspension cultures. *Biotech. Lett.* **30**: 961-965.
- Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. and Inoue, K. (1993) Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. *Biochim. Biophys. Acta* **1170**: 217-231.
- Munnik, T., Irvine, R. F. and Musgrave, A. (1998) Phospholipid signaling in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1389**: 222-272.
- Yoon, H. J., Kim, H. K., Ma, C. J. and Huh, H. (2000) Induced accumulation of triterpenoids in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures using a yeast elicitor. *Biotech. Lett.* **22**: 1071-1075.
- Dole V.P. and Meimertz H. (1960) Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* **235**: 2595-2599.
- Jung, K. M. and Kim, D. K. (2000) Purification and characterization of a membrane-associated 48-kilodalton phospholipase A₂ in leaves of broad bean. *Plant Physiol.* **123**: 1057-1067.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Rordorf, G., Uemura, Y. and Bonventre, J. V. (1991) Characterization of phospholipase A₂ (PLA₂) activity in gerbil brain: enhanced activities of cytosolic, mitochondrial, and microsomal forms after ischemia and reperfusion. *J. Neurosci.* **11**: 1829-1836.
- Scherer, G. F. E. and Arnold, B. (1997) Inhibitors of animal phospholipase A₂ enzymes are selective inhibitors of auxin dependent growth: implications for auxin-induced signal transduction. *Planta* **202**: 462-469.
- Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K. and Dennis, E. A. (1995) Inhibition of macrophage Ca²⁺-dependent phospholipase A₂ by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J. Biol. Chem.* **270**: 445-450.
- Street, I. P., Lin, H. K., Laliberte, F., Ghomashchi, F., Wang, Z., Perrier, H., Tremblay, N. M., Huang, Z., Weech, P. K. and Gelb, M. H. (1993) Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A₂. *Biochemistry* **32**: 5935-5940.

(2008년 12월 30일)