

고려 인삼 진세노사이드에 의한 동물 세포막 수용체 및 이온 통로 인식 위치 확인에 대한 최신 연구 동향, 기법 및 응용에 대하여

Recent Studies on Identification of Ginsenoside Interaction Sites with Cell Membrane Ion Channels and Receptors

나승열

건국대학교 수의과대학 인삼학 연구실 및 생리학 교실

Seung-Yeol Nah

Ginsentology Research Laboratory and Department of Physiology College of Veterinary Medicine, Konkuk University Seoul Korea 143-701

1. 서론

고려 홍삼을 포함한 인삼은 우리나라 고유의 고기능성 식품으로서 다양한 효능이 있는 것으로 보고 되어 있어 건강 유지 및 질병 예방을 위하여 널리 이용되고 있다. 우리나라에서만 인삼 단일 품목으로서 1조원에 가까운 인삼 시장이 형성되어 있고 점차 확대되고 있다. 이와 더불어 인삼 관련 회사들이 많이 늘고 있다. 또한, 지자체가 활성화되면서 고수익 장려 품목으로 지정되어 인삼 재배 농가가 급속도로 증가하고 있다. 인삼 재배의 증가는 좋은 일이나 그에 대한 수요는 좀처럼 늘지 않고 있어 증가 생산된 인삼을 소비할 수 있는 인삼 연구 및 인삼 관련 산업에 새로운 돌파구가 필요한 시점에 이르렀다고 생각할 수 있다. 다만 최근에 신종 인플루엔자의 유행으로 면역력 증강을 위하여 인삼의 수요가 일시적 수요가 증가하고 있는 것으로 보도되고 있다.

한국 사람의 경우에는 고려인삼이 건강에 좋다는 것은 인삼 이용의 오랜 역사와 민속의약 및 민간 경험에 비추어볼 때

누구나 인정하고 있다. 그러나, 인삼이 어떻게 작용하여 건강에 유익한 작용을 하는가에 대하여 조금만 더 깊이 문헌 조사를 할 경우 다른 의약품들과는 달리 정확하게 설명할 수 있는 근본적인 작용 원리 및 이를 뒷받침할 증거들이 미약한 것이 현실이다. 따라서 이런 이유들이 인삼을 현재 의약품이라기보다도 기능성 식품으로서만 이용되도록 허용된 것으로 보인다.

1960년도 초반에 일본 과학자들에 의하여 그 특성이 밝혀진 진세노사이드 (인삼 사포닌으로도 부름)가 지금까지 인삼의 주요 유효 성분으로서 인정받고 있다. 약 30 여종 이상의 다양한 진세노사이드가 인삼에서 분리되고 있다. 진세노사이드를 이용한 연구들이 활발하여 인삼과 관련된 국내 및 국제 학술지 대다수가 진세노사이드의 작용에 대하여 언급하고 있다. 인삼 관련 식,의약품 회사들도 자사 제품에 진세노사이드가 얼마 함유되어 있음을 표기 한다. 진세노사이드를 이용한 연구 결과들을 보면 진세노사이드의 작용은 장기 (organs) 들 및 세포의 종류에 따라 그 작용도 다양한 것으로

Corresponding author : Prof. Seung-Yeol Nah
Ginsentology Research Laboratory and Department of Physiology,
College of Veterinary Medicine
Gwangjin-Ku, Seoul Korea
Tel : 02-450-4154
Fax: 02-450-3037
E-mail : synah@konkuk.ac.kr

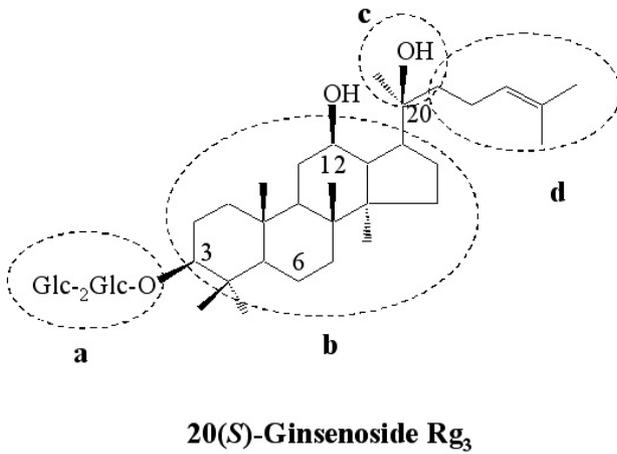


그림 1. 20(S)-진세노사이드 Rg₃ 구조. 진세노사이드는 네 부위 나눌 수 있다. a, 당 부위. b, 골격 부분. c, epimer 위치. d, aliphatic side chain.

나타나고 있다 (Nah, 1997).

현대 의약품으로 활용되고 있는 거의 모든 의약품들은 그 구조가 잘 밝혀져 있고, 그 구조의 특징들 또한 잘 알려져 있어, 이들 의약품들의 작용기 (functional group) 들을 변형시켜 적은 양을 투여하더라도 약물의 효과를 극대화시키는 방향으로 연구가 진행되고 있다. 진세노사이드도 지금까지의 연구들을 통하여 분자량이 약 600-1200 dalton이며, 몇 가지 특징들이 알려져 있다. 즉, 진세노사이드는 세부위로 구성되어 있다 (그림 1). 1) Triterpenoid 골격 부분, 2) aliphatic side chain, 3) 당 (carbohydrates) 부분이다. 진세노사이드를 섭취할 경우 진세노사이드는 분해 되어 먼저 대부분의 당들이 제거되고, aliphatic side chain이 변형된 골격 구조가 배설되는 것으로 알려져 있다.

진세노사이드가 정말 고려 홍삼을 포함한 인삼의 대표적 생리학적/약리학적 유효 성분으로서 인정을 받으려면 진세노사이드 구조를 구성하는 부위 중에서 진세노사이드의 작용을 설명할 수 있는 작용기 (functional group)가 있어야 되고, 그 역할들을 밝혀낼 경우 진세노사이드가 그 효능을 발휘하기 위하여 세포막 단백질과 어떻게 상호 작용하여 그 효능을 발휘하는가를 설명하는 것이 가능해야 할 것이다. 또한 이를 토대로 진세노사이드의 작용 원리를 설명하는 것이 가능하고 진세노사이드 및 진세노사이드 유도체 (ginsenoside-derivatives) 관련

새로운 의약품 개발도 가능하다. 이러한 연구는 인삼 재배 농가의 소득 증대, 인삼 관련 산업 및 인삼을 의약품 화하여 많은 부가가치를 올리는데 기여하며 인삼의 연구를 한 단계 더 발전시키는 계기가 되리라 생각된다. 그러나, 동물 세포막 단백질과 어떻게 작용하는가에 대한 진세노사이드의 작용 원리에 대한 기초 연구에 관한 것은 미약하며 아직 많이 보고 되고 있지 않다.

본 내용에서는 진세노사이드 Rg₃를 중심으로 하여 첫째, 진세노사이드가 지니고 있는 세 부위의 특징들이 단일 세포 (single cell) 기능에 어떤 영향을 미치는가와, 두 번째, 진세노사이드가 세포의 항상성 (homeostasis) 유지를 위하여 필요한 여러 종류의 세포막 단백질들 (이온 통로 및 수용체들)과 인식 및 상호 작용이 생리학/약리학적으로 어떤 역할과 연계될 수 있는가를 논할 예정이다. 이것은 지금까지 밝혀진 진세노사이드의 작용 원리 및 새로운 연구 기법을 설명하는 계기가 되고, 진세노사이드의 작용에 대한 이해를 증진하는데 도움이 될 것이다. 끝으로, 인삼 관련 연구 기관이나 인삼 관련 산업체에 근무하는 종사자들에게도 본 내용이 진세노사이드의 작용 양식을 통하여 인삼의 효능의 기본 원리를 설명하는데 조금이라도 더 유용한 도움이 되고자 한다.

2. 본론

1. 진세노사이드가 생리활성 작용을 발휘하는데 있어서 진세노사이드를 구성하는 각 부분들 [stereoisomers, 당 (carbohydrates), aliphatic side chain 및 골격 (backbone)]의 역할

본 장에서는 진세노사이드를 각 부위 (stereoisomer, 당, aliphatic side chain 및 골격)로 나누고, 각 부분의 역할을 각 부분의 변형 (modifications) 혹은 구조의 특성을 통하여 이들 각 부위가 진세노사이드의 생리/약리 활성 작용에 어떤 역할을 담당하고 있는가를 고찰하고자 한다.

1) 진세노사이드 Rg₃는 여러 진세노사이드들 중 대표적 모델 성분으로서 진세노사이드와 동물 세포막 단백질 인식/상호 작용 부위 확인 연구에 이용된다.

진세노사이드 Rg₃의 정식 화학명은 20(S)-ginsenoside Rg₃,



20-S-protopanaxadiol-3-[O-β-D-glucopyranosyl (1→2)-β-glucopyranoside]) 이고 그것의 epimer로서 20(R)-ginsenoside Rg₃, 20-R-protopanaxadiol-3-[O-β-D-glucopyranosyl (1→2)-β-glucopyranoside])이 있다. 진세노사이드의 화학 구조는 그림 1에 나와 있다. 진세노사이드 Rg₃는 수용체를 조절하는데 있어서 세포 밖에서 작용 한다 (Lee 등, 2004). 진세노사이드 Rg₃는 두개의 당이 탄소 3번 위치에 부착되어 있고, 탄소 20번 위치의 hydroxyl group의 위치에 따라 epimers로 존재한다. 이와 같이 진세노사이드 Rg₃는 stereoisomers로 존재한다. 또 탄소 20번 위치에 6개의 탄소를 구성된 aliphatic side chain $[-(CH_2CH_2CH = C(CH_3)_2)]$ 이 부착되어 있다.

2) 동물 세포막 단백질은 진세노사이드 Rg₃의 탄소 20번 위치에 있는 hydroxyl group를 구별하여 반응한다.

Jeong (2004) 등, Kang (2005) 등 및 Lee(2007) 등은 진세노사이드 Rg₃가 세포막 단백질과 상호 작용하여 그 효과를 발휘하는데 있어서 진세노사이드 Rg₃의 탄소 20번에 있는 hydroxyl group의 역할을 확인하는 연구를 실시하였다. 연구 결과 대표적 이온 통로들을 조절하는데 있어서 20(S)-ginsenoside Rg₃는 세포막 단백질과 상호 작용하여 그 효과를 발휘하는데 반하여, 20(R)-ginsenoside Rg₃는 아무런 효과가 없는 것으로 나타났다. Kim (2006) 등은 swine coronary artery의 수축 이완을 조절하는데 있어서도 20(S)-ginsenoside Rg₃와 20(R)-ginsenoside Rg₃가 stereoisomeric 작용 양식을 보여주는 것으로 보고하였다. 이러한 연구 결과는 20(S)-ginsenoside Rg₃와 20(R)-ginsenoside Rg₃라는 아주 작고 미묘한 구조적 차이를 세포막 단백질은 인식하고 그에 반응하는 것으로 생각된다.

3) 진세노사이드 Rg₃의 탄소 3번 위치에 있는 두개의 당(carbohydrates)은 진세노사이드 Rg₃가 동물 세포막 단백질 작용을 조절하는데 중요한 역할을 한다.

진세노사이드는 소수성 부위 (hydrophobic portion)와 친수성 부위 (hydrophilic portion)를 지닌 양극성 (amphiphilic property) 성질을 가지고 있다. 진세노사이드 Rg₃는 다른 진세노사이드들과는 달리 탄소 3번 위치에 포도당 2분자를 가지고 있다. 20번 위치에는 당이 없다. Na⁺ 이온 통로를 조절하는

데 있어서 진세노사이드 Rg₃의 포도당들의 역할을 알기 위한 Kim (2005) 등은 3가지 방법을 이용하여 확인하였다. 1) 두 포도당을 없애거나 (이를 protopanaxadiol이라 부른다), 2) 포도당 하나를 제거하거나 (이를 진세노사이드 Rh₂이라 부른다), 3) 화학적으로 포도당을 변형시키는 방법이 있다. Na⁺ 이온 통로를 조절하는데 있어서 온전한 상태의 작용을 100%로 보았을 때 당이 하나만 존재하는 경우에는 거의 효과 미약한 것으로 나타났고, 당이 없거나, 당을 변형시켰을 경우에는 마찬가지로 효과가 없는 것으로 나타나 진세노사이드 Rg₃에 부착된 두 개의 당이 모두 요구되는 것으로 나타났다. 또한, 진세노사이드 Rg₃에서 떨어져 나온 두개의 당은 sophorose라고 불리우는데 sophorose 역시 Na⁺ 이온 통로를 조절하는 능력이 없는 것으로 나타났다 (Kim 등, 2005). 이와 같이 진세노사이드 Rg₃에 부착된 당들은 그 자체에는 효과가 없으나, 진세노사이드 Rg₃가 그 역할을 하는데 관여하고 있음을 보여 주고 있다. 뒤에서 두 개의 당이 동물 세포막 단백질을 인식하는데 있어서 어떤 역할을 하는가에 대하여 더 자세히 언급할 것이다.

4) 20(S)-ginsenoside Rg₃의 탄소 20번 위치에 부착된 aliphatic side chain $[-(CH_2CH_2CH = C(CH_3)_2)]$ 변형은 진세노사이드 Rg₃의 기능이 없어지거나 강화시키는 역할이 있다.

그림 1에서 보는 바와 같이 20(S)-ginsenoside Rg₃의 탄소 20번 위치에 부착된 aliphatic side chain이 진세노사이드의 생리활성 작용에 있어서 어떤 역할을 하고 있는가에 대한 것은 많이 밝혀진 바가 없다. Lee (2008) 등은 그 역할을 연구하였는데, 그 역할에 대한 연구 방법으로는 aliphatic side chain을 제거한 것과 제거하지 않은 진세노사이드 Rg₃와의 생리활성 정도를 비교하는 것이고, 다른 한 가지는 탄소 23과 탄소 24번 위치에 이중 결합이 존재하는데 이 이중 결합을 환원시킨 다음, 즉 단일 결합 (single bond)으로 만든 다음 변형하기 전의 진세노사이드 Rg₃와 그 생리활성 정도를 비교하는 것이다. 먼저 진세노사이드 Rg₃의 나머지 부분은 온전한 상태에서 aliphatic side chain만을 제거할 경우 그 생리활성 작용은 거의 없는 것으로 나타났다. 그에 반하여 aliphatic side chain에 존재하는 이중 결합을 단일 결합으로 변형시킬 경우 그 생리활성이 3-4 배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과들은 진세노사이드 Rg₃의 aliphatic side chain의 변형은 진세노사이드

드 Rg₃이 생리활성을 하는데 있어서 효현제 (agonist) 역할을 하도록 도와주는 역할이 있음을 보여 주고 있다. 따라서 미래 연구에서는 이 aliphatic side chain의 변형을 통하여 기존의 진세노사이드 보다 더 강력한 진세노사이드 효현제 (agonist) 혹은 진세노사이드 작용을 막는 진세노사이드 길항제 (antagonist)의 합성 혹은 생산이 가능하리라고 생각된다.

5) 20(S)-ginsenoside Rg₃의 골격 (backbone)은 진세노사이드 Rg₃의 주요 부분으로 부착된 당과 aliphatic side chain이 세포막 단백질에 대한 작용 위치 선정과 막 단백질의 기능에 대한 물리적 차단 역할을 할 가능성이 있다.

그림 1에서 보는 바와 같이 진세노사이드 Rg₃의 당 부분과 aliphatic side chain을 제외할 경우 골격 부분이 남는데, 진세노사이드가 생리활성을 발휘하는데 있어서 이 골격 부분에 대한 역할을 찾는 데 어려움이 있다. 먼저 골격 부분에 많은 메틸기 (methyl group)이 부착되어 있고, 당과 aliphatic side chain과는 달리 이 골격 구조를 변형시키거나 제거하는 방법이 현재 까지 개발, 발견되지 않고 있다. 한 가지 가능성은 유전적인 방법을 이용하는 것으로 진세노사이드를 생성하는 인삼에서 진세노사이드 골격 부분이 합성하는 과정에 포함된 효소(들)의 작용을 억제하거나 방해하여 변형된 골격 구조 (예, 메틸기를 부착하는 효소를 억제 혹은 차단하여 메틸기 수를 줄이거나 없애는 진세노사이드 생성)를 가지고 생리 활성 작용을 기존의 진세노사이드와 비교하여 골격 구조의 역할을 추론하는 방법이 있다. 골격 부분의 역할에 대하여서 이해할 수 있는 방법은 변형이 어렵기 때문에 상상을 통하여 이루어 질 수 있다. 예를 들면, 골격 구조는 수소성 (hydrophobicity)을 지닌 구조이기 때문에 이 골격 구조는 세포막 단백질과 hydrophobic interaction을 할 가능성이 있다. *In vitro* 혹은 *in vivo*로 진세노사이드를 처리할 경우 3차원 적인 막 단백질의 움푹 들어간 pocket 부분 [이 부분은 이온 통로의 pore 및 pore 주변이 될 수도 있고, 수용체의 리간드 (ligand) 결합 자리도 될 수 있다]에 진세노사이드 골격 구조가 hydrophobic interaction에 의하여 결합할 경우 (이 결합은 진세노사이드가 막 단백질과 상호 작용하여 생리활성을 발휘할 정도로 강한 결합이 아님), 즉 자리를 잡을 경우, 이어서 진세노사이드의 당 부분이 이웃해 있는 세포막 단백질을 구성하는 아미노산들과 수소 결합 (hydrogen

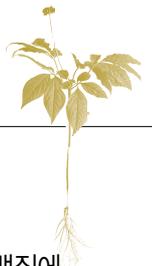
bonds)을 형성하고 (이 결합은 진세노사이드가 막 단백질과 상호 작용하여 생리활성을 발휘할 정도로 결합임), 이때 골격 구조에서 뺀어 나온 aliphatic side chain은 수용체 리간드의 결합이나 이온의 흐름을 막거나 혹은 더 강화시켜 주는 역할을 할 수 있을 가능성이 있다 (이에 대한 자세한 논의는 뒤에 나옴).

II. 동물 세포막 단백질에 대한 진세노사이드 인식 자리 확인 연구

1. 동물 세포막 단백질과 리간드 상호 작용 연구 방법 소개

신경계 및 비신경계에 작용하는 많은 약물들(drugs) (예, lidocaine) 이나 독소 (toxins, 예, TTX, 등등)들에 의한 수용체 (GPCRs), 이온 통로나 ligand-gated 이온통로 조절을 하는 것으로 알려져 있는데 이들 약물이나 독소에 의한 상호 작용 위치, 즉 어느 아미노산과 상호 작용하는 가를 밝히는 연구는 주로 site-directed mutagenesis 방법에 의하여 이루어진다. 이 방법은 이온 통로나 ligand-gated 이온 통로를 구성하는 아미노산중 약물이나 독소와 상호 작용할 것으로 예상하는 위치에 있는 한 가지 혹은 한 가지 이상의 아미노산을 성질이 다른 아미노산 [예, 무극성 아미노산을 극성 아미노산 혹은 반대로, side chain이 짧은 아미노산을 side chain이 긴 아미노산으로, 혹은 반대로, 주로 wild-type에 존재하는 아미노산을 알라닌 (alanine)으로 돌연변이 시켜 바꾼다]으로 바꾼 다음 (즉 이를 point mutation이라고 부른다). 돌연 변이된 이온 통로나 ligand-gated 이온 통로를 expression시킨 다음 같은 약물을 이용하여 wild-type 이온 통로나 ligand-gated 이온 통로와 비교 연구한다. 특정 아미노산이 돌연 변이된 mutant 이온 통로나 mutant ligand-gated 이온통로에 대하여 약물에 의한 조절 효과가 wild-type과 차이가 없이 계속 유지된다면 약물이나 독소의 작용위치가 아니라고 생각하고, 만약 약물이나 독소의 효과가 없어지거나 줄어든다면, 즉 IC₅₀ (50% inhibition concentration) 숫자를 측정할 수 없거나 통계학적으로 유의성 있게 증가하거나, 약물이나 독소의 효과가 없어진다면, 즉 소멸된다면 그 약물의 인식 부위 혹은 상호 작용 위치가 mutation이 일어난 자리라고 생각할 수 있다.

이러한 연구 기법을 이용하여 L-type 칼슘 이온 통로에 작용하는 약물, 즉 항고혈압제 계통의 약물들이 작용하는 위치가



밝혀졌다. 또한, 소듐 채널 blocker인 복어에서 분리되는 독소인 tetrodotoxin (TTX)와 국소 마취제 및 심장 부정맥 치료 약물로 쓰이는 lidocaine 계통의 약물도 소듐 채널과 상호 작용하는 위치도 이 방법에 의하여 밝혀졌다. 반대로 소듐 채널 activator인 batrachotoxin (BTX)의 작용 위치도 이 방법에 의하여 밝혀졌다. 포타슘 채널에 작용하는 약물들의 상호 작용 위치도 이 방법에 의하여 밝혀졌다. 또한, ligand-gated 이온 통로들의 작용 위치도 site-directed mutagenesis 방법에 의하여 밝혀졌다.

2. 동물 세포막 단백질 (수용체 및 이온 통로) 들에 대한 진세노사이드 인식 자리 확인 연구 기법

앞에서 언급한 바와 같이 인삼의 대표 유효성분으로서 진세노사이드가 대부분의 약물이나 신경 전달 물질, 호르몬과 같이 1차 messengers은 그들의 생리 혹은 약리 활성을 발휘하기 위하여서는 반드시 그들은 세포막에 존재하는 그들의 수용체를 인식 (상호작용)하고 수용체를 활성화시킨다 (이 현상을 Lock-and-Key concept 혹은 theory라고 부른다) (Limbird, 2004; Rang, 2004). 활성화된 수용체는 신호 전달 과정 (signal transduction pathways)을 거쳐서 2차 messengers를 생성시키고 이들은 이어서 effect systems (3rd messengers)에 영향을 미쳐 세포질에 존재하는 각종 효소들의 활성, 세포막에 존재하는 이온 통로들의 활성 및 억제, 끝으로 핵의 전사(transcription)를 조절하는 과정을 거쳐서 단백질 합성이 이루어지고 세포에 대한 영향이 장기 및 생체 전체에 일어나도록 한다.

이와 유사하게 정말로 진세노사이드가 각종 생리 및 약리 활성을 지닌 1st messenger 약물로서 작용하는 것이라면 위에서 언급한 과정 혹은 이와 유사한 과정을 거쳐야 하고 이를 증명하는 것이 인삼 연구의 발전과 인삼의 활용이 증대할 것이다. 앞에서는 진세노사이드의 구성 성분들이 진세노사이드 생리 활성을 유발하는데 있어서 진세노사이드를 구성하는 각 부위가 어떤 역할을 하는 가를 살펴보았다. 이장에서는 진세노사이드가 세포막 단백질의 어느 부위를 인식하고 어떤 방식으로 상호 작용하는 가를 돌연 변이 방법 (site-directed mutagenesis method) 과 삼차원적인 모델링 방법 (docking modeling)을 이용하여 관찰하고자 한다.

3. 생리적 역할을 가지고 있는 동물 세포막 단백질에 대한 진세노사이드 인식 자리 확인 접근 방법

세포막에 존재하는 각종 수용체 (예, GTP-binding protein coupled receptors, GPCRs)나 이온 통로들 (voltage-gated ion channels 및 ligand-gated ion channels)은 보통 세포막 바깥에 노출되어 있는 N-terminal 부위와 세포막을 가로질러서 (transmembrane, TM) 세포막 lipid bilayer를 끼어 있는 부위 (TM domain)와 세포질 안쪽으로 뻗어져 나온 C-terminal 부위로 구성되어 있다. 먼저 GTP-binding protein coupled receptors과 같은 수용체의 경우 간략하게 기술하면 N-terminal에는 주로 리간드 인식 및 결합 자리가 있고, 리간드와 경쟁적으로 작용하는 약물들도 N-terminal에 결합하는 것으로 알려져 있다. Lipid bilayer에 있는 부분은 리간드가 N-terminal에 결합할 경우 그 단백질의 형태적 변화 (conformational changes)를 유발시켜 수용체가 활성화되어 이 수용체와 연결되어 있는 GTP-binding proteins이 활성화되고, 이들은 다시 effector 효소들을 활성화시키거나 억제하여 그 효과를 발휘하게 된다. C-terminal에는 각종 PKA 혹은 PKC와 같은 kinases에 의하여 인산화되는 자리가 있고 이들에 의하여 C-terminal의 아미노산 (주로 serine, 혹은 threonine)이 인산화될 경우 리간드가 계속 존재하여 수용체를 자극하더라도 더 이상 반응이 일어나지 않은 탈감작을 유도하는 것으로 알려져 있다.

전압의존성 이온 통로들 (voltage-gated ion channels)은 간략하게 기술하면 세포막 전압 (membrane potential)에 변화에 의존하여 이온 통로가 열렸다 닫혔다 한다. 이들 역시 N-terminal, TM domain 및 C-terminal로 구성되어 있다. 보통 TM domain에 막 전압을 감지하는 sensor 및 특정 이온의 흐름을 조절하는 pore을 형성하는 부위가 있다. C-terminal에는 kinases에 의하여 인산화되는 자리들이 있다. 보통 이온 통로에 작용하는 독소 (예, 복어독)나 약물 (예, 항 고혈압제, 국소 마취제등)들은 주로 pore 및 pore와 이웃하고 있는 TM domain에 결합하여 그 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다.

Ligand-gated 이온 통로 (ligand-gated ion channels)의 경우 역시 N-terminal에 리간드가 인식 결합하는 부위가 있고, 리간드가 N-terminal에 결합할 경우 TM domain에 있는 pore를 형성하는 부위의 형태 변화로 닫혔던 pore가 열리어 칼슘/소디

움 (예, Nicotinic acetylcholine receptor, NMDA receptor, 5-HT₃ receptor, P₂X receptor 등)이 들어가고 포타슘이 나가게 되어 세포를 흥분(depolarization)시킨다. 반대로 클로라이드 (Cl⁻) (예, GABA_A receptor 및 glycine receptors)가 들어가게 하여 hyperpolarization 유발하고 흥분성 세포의 흥분 유발을 억제한다. Ligand-gated 이온 통로에 작용하는 약물들은 N-terminal에 작용하거나, TM domain의 다른 부분 혹은 pore 및 pore 주변에 작용하는 것으로 알려져 있다.

이와 같이 세포막을 구성하는 단백질중의 수용체들이나 이온 통로들은 그 분자량이 수만 dalton에서 수십만 dalton에 이르고 아미노산도 수백 개에서 천개가 넘는데 진세노사이드가 세포막 단백질을 인식/상호 작용을 통하여 그 효능을 발휘한다면 그 작용 위치를 어떻게 찾아낼 것인가 사실 진세노사이드 인식 부위를 찾아내는 연구는 어려운 작업이다. 한 가지 도움이 되는 것은 분자 생물학의 눈부신 발전으로 이들 수용체나 이온 통로의 염기서열 및 아미노산 순서가 거의 다 밝혀져 있어 NIH data base를 통하여 쉽게 그 순서들을 확인할 수 있고, 염기 서열의 어느 부분이 N-terminal, TM domain, voltage sensor, pore 및 C-terminal을 구성하고, 이들 중 어느 부분에 당이 붙는 자리이고, 인산화가 되는 자리이고 또 어느 부분의 아미노산이 약물이나 독소 결합 자리인지를 확인할 수 있다. Lee (2007)등은 처음으로 많은 문헌 조사를 통하여 얻은 정보는 수용체나 이온 통로에 결합하여 그 효과를 발휘하는 약물들은 대부분이 같은 위치에 존재하는 아미노산들을 공유한다는 것과 ligand-gated ion channels에 대한 진세노사이드 조절은 리간드와 경쟁 관계를 통하여 이루어지지 않고 있다는 사실을 발견하였다. 이러한 사실들은 ligand-gated ion channels 조절에 있어서 진세노사이드는 리간드 결합자리에는 인식/결합하지 않는다는 것과 진세노사이드도 다른 약물들이나 독소들과 같은 위치의 아미노산을 공유 및 상호 작용을 통하여 그 효능을 발휘할 가능성을 보여주고 있다. 따라서 Lee (2007)등은 가장 공통적으로 여러 약물이 작용하는 부위를 site-directed mutagenesis을 실시하고 그 범위를 점차 넓혀 가는 방법을 이용하였다.

4. 동물 신경 세포막에 존재하는 ligand-gated 이온 통로들 (5-HT₃ receptor 및 α7 nicotinic acetylcho-

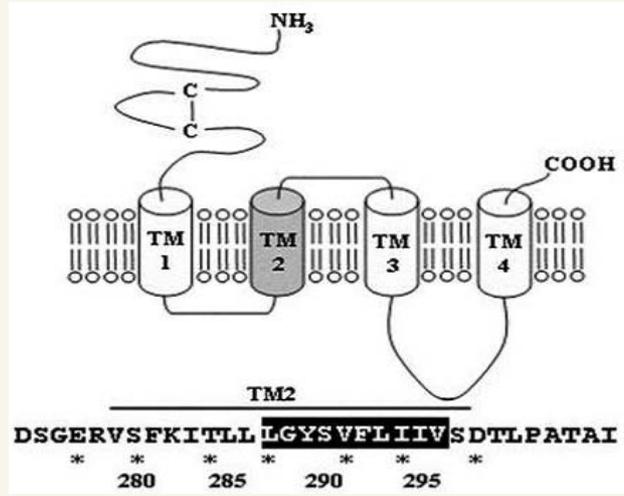


그림 2. 5-HT₃ 수용체 구조. 5-HT₃ 수용체는 N-terminal에 cys-loop를 가진 구조로 구성되어 있으며 이것은 GABA_A, nicotinic acetylcholine 및 glycine receptor에 공통이다. 네 개의 transmembrane (TM) domain이 있고, 다섯 개가 모여서 하나의 온전한 수용체를 구성한다. N-terminal에는 serotonin이 결합하는 자리가 있고, TM2는 pore를 형성하는 것으로 알려져 있다. TM2의 돌연 변이된 아미노산들은 검은 box로 표시되어 있다.

line receptor) 및 전압 의존성 이온 통로들 (voltage gated Ca²⁺, K⁺ 및 Na⁺ channels) 대한 진세노사이드 인식 자리 확인

지금까지의 연구 결과들을 볼 때 진세노사이드가 모든 생체막 수용체들, ligand-gated ion channels이나 이온 통로 모두를 조절하지 않은 것으로 보아 진세노사이드에 의한 생체막 단백질들과의 상호 작용은 non-specific이 아니고 specific manner로 이루어지고 있음을 먼저 언급하고자 한다.

1) Ligand-gated 이온 통로에 대한 진세노사이드 인식/상호 작용 위치 확인

(1) 5-HT₃ 수용체 (세포토닌 3형 수용체):

이 수용체는 네개의 TM domain으로 구성되어 있고, 이것의 오량체 (pentamer)가 하나의 온전한 수용체를 구성한다 (그림 2). 주로 중추 신경계와 말초 신경계에 존재하고 그 기능으로서는 과민성 대장염 (irritable bowel syndromes), 항암제 투여, 멀미 및 여러 원인과 관련된 구토 (vomiting) 및 최근에는 정신 질환과도 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 진세노사이드를 위에서 언급한 여러 5-HT₃ 수용체 관련 질환을 치료 혹은 완화하는 데 활용할 수 있을 것으로 기대한다.



Lee 등은 (2007) 진세노사이드는 이 수용체를 5-HT와는 non-competitive manner로 조절하는 것으로 나타나 그 작용 위치를 확인하는 연구는 주로 ion 통로 pore 부위를 형성하는 10개의 아미노산들 (287번째 아미노산에서 295번째 아미노산까지)을 중심으로 site-directed mutagenesis를 실시하여 돌연 변이 5-HT₃ 수용체들을 준비한 다음 돌연 변이를 시키지 않은 5-HT₃ 수용체 (이를 wild-type이라 부름)와 진세노사이드 작용이 어떻게 변화하였나를 연구하였다. 연구 결과 여러 아미노산들 중에서 291번째에 존재하는 valine (Val), 292번째에 존재하는 phenylalanine (Phe)을 혹은 295번째에 존재하는 isoleucine (Iso)을 alanine (Ala)으로 돌연변이 시킬 경우 진세노사이드 Rg₃의 억제 작용이 소멸되거나 유의성 있게 줄어드는 것으로 나타났다. 또한, 291번째에 존재하는 valine을 alanine으로 돌연 변이시킬 때, 이 돌연 변이 수용체에서는 5-HT를 처리하지 않더라도 자발적(constitutively)으로 이온 통로가 열리면서 이온 통로가 wild-type에 비하여 천천히 닫히는데, 이때 진세노사이드 Rg₃를 처리할 경우 이 자발적으로 열리는 이온 통로를 억제할 뿐만 아니라, 이온 통로가 빨리 닫히도록 하는 작용이 있음을 보고하였다. 진세노사이드 Rg₃와 마찬가지로 TMB (5-HT₃ 수용체 open channel blocker) 역시 이 돌연 변이 이온 통로의 자발적으로 열리는 것을 차단하였다. 또 다른 5-HT₃ 수용체 open channel blocker인 diltiazem는 진세노사이드 Rg₃에 의한 돌연변이 이온 통로 억제 작용을 막지 않은 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과들은 진세노사이드 Rg₃는 TM₂의 valine, phenylalanine, 및 isoleucine과 상호 작용을 통하여 5-HT₃ 수용체를 조절함을 보여주었고, 또한, TMB-8이나, diltiazem과는 다른 자리에서 5-HT₃ 수용체가 열려 있을 때 작용하는 open channel blocker로서 작용함을 증명하였다.

(2) $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine 수용체:

이 수용체의 구조는 5-HT₃ 수용체와 같은 family에 속한다. 중추 신경계 전반에 걸쳐서 널리 분포하여 존재한다. 주로 수용체는 학습 및 기억력을 관장하고, 수용체 기능 이상은 Alzheimer disease, 정신 분열증 (schizophrenia), 간질 (epilepsy)과도 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.

앞에서 언급한 바와 같이 $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor는 신경계에 존재하는 nicotinic acetylcholine receptors의 하

나로 β 나 다른 subunits 없이 α subunit가 5개 모여서 하나의 온전한 homomeric 수용체이다. 이 수용체 역시 5-HT₃ 수용체와 cysteine loop를 지닌 수용체 family의 하나이다. 앞에서 보고 되어 온 연구에서 진세노사이드는 $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$, and $\alpha 4\beta 2$ 수용체 활성화시 나타나는 내향성 전류 (inward currents)들을 억제하지만 $\alpha 7$ 수용체를 억제하지 않은 것으로 보고하였다 (Choi 등, 2002; Lee 등, 2009). 진세노사이드는 wild-type의 $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor channel activity에는 영향을 미치지 않은 것으로 보고 되었으나, 5-HT₃ receptor에서처럼 TM₂에 존재하는 특정 아미노산, 즉 leucine 247을 threonine 혹은 다른 아미노산으로 mutation시킬 경우 mutant $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor channel activity를 진세노사이드가 억제하는 것으로 나타나, 아마도 진세노사이드는 5-HT₃ receptor와 비슷하게 TM domain에 존재하는 아미노산과 상호 작용을 통하여 $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor channel activity를 조절하는 것으로 생각할 수 있다.

2) 전압 의존성 이온 통로들 (voltage-gated ion channels)에 대한 진세노사이드 인식/상호 작용 위치 확인

(1) Voltage-gated Na⁺channels (Nav)

이 이온 통로는 네 개의 domain이 있고 이 domain은 다시 6개의 segment로 구성된 분자량이 큰 단백질이고 보조 β subunits이 있다 (Hille, 2001). 각 domain의 segment 4에는 막 전압 변화를 감지하는 voltage sensor가 있고, 각 domain의 segment 5와 6은 이온의 흐름 허용하는 pore 부분을 형성한다 (그림 3). Voltage-gated Na⁺channels (Nav)은 신경 세포, 심근 세포 및 근육 세포와 같은 흥분성 세포들에 존재한다. Voltage-dependent Na⁺channels은 매우 빠르게 (수 ms 내) 활성화되고 또한 수 ms 내 불활성화 (inactivation)된다. 이때 세포안쪽으로 내향성 Na⁺ 전류 생성한다. Voltage-dependent Na⁺ channels의 활성화는 신경세포의 axon이나 체세포 (somatic portion)에서 활동 전위 (action potentials)을 유발하는데 직접적으로 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 이들 채널은 또한 신경 세포의 한쪽 부위에서 다른 부위로 axonal 혹은 dendritic 정보 (information)을 전파하거나 다른 세포로 정보를 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Voltage-dependent Na⁺ channels의 종류는 신경계의 부위 혹은 신경세포의 종류에 따

라 많은 종류가 알려져 있다. 심근 및 근육 세포들에도 voltage-dependent Na⁺ channels이 존재하여 심장의 수축 유도에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 많은 종류의 독소 (toxins) 및 약물들이 이 이온 통로에 작용하여 그 효과를 발휘 하는 것으로 보고 되고 있다.

진세노사이드에 의한 voltage-dependent Na⁺channels 조절에 보고들에 따르면, 여러 진세노사이드중에서 진세노사이드 Rg₃가 가장 강력하게 뇌 및 심장에 존재하는 voltage-dependent Na⁺channels을 억제하는 것으로 보고되어 있다 (Lee 등, 2005). 진세노사이드 Rg₃에 의한 소듐 채널 조절 기작 연구를 site-directed mutagenesis 연구를 통하여 실시한 결과 진세노사이드 Rg₃는 소듐 채널이 resting 혹은 open state에 있을 때 억제하는 것으로 나타났으며, use-dependent inhibition을 보여주었다. 또한, steady state activation voltage를 탈분극 쪽으로 통계학적으로 유의성 있게 shifting 시켰으나, steady-state inactivation voltage에는 영향이 없는 것으로 나타났다. 소듐 채널에 channel entrance, channel pore, lidocaine/TTX 결합 자리 및 voltage sensor에 대한 mutations 연구에서 다른 자리에는 큰 영향이 없었으나, domain II에 존재하는 voltage-sensor의 특정 아미노산 residue인 lysine589 (Lys859)을 mutation시킬 경우 진세노사이드 Rg₃에 steady state activation voltage를 탈분극 쪽으로의 이동(shift)을 소멸시키는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과들은 진세노사이드가 소듐 채널의 domain II의 Segment 4에 존재하는 voltage-sensor와 상호 작용을 통하여 작용함을 보여주고 있다 (Lee 등, 2005).

그러나 이러한 발견은 진세노사이드가 voltage sensor에 작용하여 이온 통로의 channel kinetics에 영향을 미친다는 것이 진세노사이드의 작용이 소멸되는 것은 아닌 것으로 보아 진세노사이드가 소듐 이온 통로와 작용하는 위치는 다른 곳에 있을 가능성을 보여주고 있다. Lee (2008) 등은 진세노사이드 Rg₃가 소듐 채널에 선택적으로 작용하는 batrachotoxin (BTX, 남아메리카가 원산지인 독 개구리의 피부에서 분비되며, 원주민들이 이 독을 화살촉에 발라서 사냥에 이용하여 왔고, 이 독소는 일종의 steroidal alkaloid toxin이며, 신경계 및 근육에 존재하는 Na⁺ channels을 지속적으로 활성화시킴으로써 동물의 신경계를 마비시키는 독소이다)의 신경세포막의 결합

을 방해하거나 줄여주는 작용이 있다는 문헌 발표가 있다. 이 독소의 소듐 채널과의 결합 위치는 이 채널의 domain I segment 6 (IS6)에 위치하고 있는 isoleucine417 (Iso417), asparagine418 (Asn418) 및 leucine421 (Leu421) 번째 아미노산들과 결합/상호 작용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 Lee 등 (2008)은 이 자리를 돌연변이 시킨 다음 진세노사이드 Rg₃의 Na⁺ channel에 대한 작용에 어떤 변화가 있는가를 연구 보고하였다. 그 결과 뇌에 존재하는 Nav1.2 channel의 Asn418 및 Leu421를 Asn418Lys 및 Leu421Lys로 돌연 변이시키거나, 마우스 근육의 Nav1.4 channel의 Leu437를 Leu437Lys로 돌연 변이시킬 경우 진세노사이드 Rg₃에 의한 이들 소듐 이온 통로 조절 능력이 소실되는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과들은 진세노사이드 Rg₃가 신경계 및 근육에 존재하는 Na⁺channels을 조절하는데 있어서 BTX 결합자리를 공유하여 작용함을 보여주고 있다.

(2) Voltage-gated Ca²⁺channels (Cav)

Ca²⁺은 second messenger로서 세포에서 다양한 여러 기능을 수행한다. 세포질내 Ca²⁺증가에 일어나는 다양한 현상을 Ca²⁺ signaling이라 부른다. Ca²⁺signalings은 세포내 유리 칼슘 (intracellular free Ca²⁺) 수준 증가에 의하여 개시된다. Intracellular Ca²⁺ level의 증가는 세포 바깥에서 들어오든지 혹은 세포질내 칼슘 저장고 (endoplasmic reticulum)에 존재하는 수용체의 활성화에 의하여 저장되어 있는 Ca²⁺이 방출되어 증가한다. 먼저, 세포 외부에서 들어오는 칼슘은 신경세포나 근육 세포에서는 주로 voltage-gated Ca²⁺ channels을 통하여 세포안으로 들어온다. 칼슘 채널은 voltage-gated Na⁺ channels과 구조적으로 비슷하고 여러 종류의 보조 subunits이 존재한다. 이러한 칼슘 채널들의 종류는 L-, N-, P/Q- 및 T-types이 존재하는 것으로 알려져 있다. 신경세포들은 이들 Ca²⁺ channel subtypes을 발현 정도의 차이는 다르지만 다 발현하고 있다. 그에 반하여 근육 세포나 평활근 세포들은 주로 L-type Ca²⁺ channels을 발현하고 있다 (Hille, 2001).

진세노사이드가 voltage-gated Ca²⁺ channels을 조절하는 다음과 같이 보고되고 있다 (Nah 및 McCleskey, 2004; Nah 등, 2005). 처음 진세노사이드에 의한 신경 세포 (rat sensory neurons)에 존재하는 칼슘 채널을 조절한다는 것이 보고 되었



다. 여러 진세노사이드 Rb1, Rc, Re, Rf, 및 Rg1 중 진세노사이드 Rf가 이들 진세노사이드 중에서 N-type 및 다른 high threshold Ca^{2+} channels을 억제함을 보고하였다. 더 나아가 진세노사이드 Rg₃는 다른 진세노사이드들에 비하여 L-, N- 및 P/Q-type 칼슘 채널을 더 강력하게 억제하는 것으로 나타났다. 또한, rat chromaffin 세포에 존재하는 칼슘 채널을 진세노사이드 Rc가 가장 강력하게 억제함을 발견하였고, bovine chromaffin 세포에서는 total 진세노사이드가 N-, P-, Q/R-type 칼슘 채널을 억제하지만 L-type 칼슘 채널은 억제하지 않은 것으로 나타났다(Choi 등, 2001).

어느 단일 진세노사이드와 진세노사이드 대사체(metabolites) 중에서 여러 칼슘 채널 subtype에 가장 강력하게 조절하는 가를 확인하기 위한 연구를 위하여 *Xenopus laevis* oocytes에 heterologously expressed된 L-, N-, P/Q- 및 T-types 칼슘 채널들을 각각 expression 시킨 다음 실시한 연구에서 total ginsenosides는 여러 types중에서 T-type 칼슘 채널을 가장 강력하게 억제하는 것으로 났고, 여러 진세노사이드 Rb1, Rc, Re, Rf, Rg₁, Rg₃ 및 Rh₂중에서 진세노사이드 Rg₃가 강력하게 다섯 가지 칼슘 채널 subtypes을 억제하는 것으로 나타났고, 진세노사이드 Rh₂는 L- 및 R-types을 억제하는 것으로 나타났다. 진세노사이드 metabolites중에서 compound K (protopanaxadiol ginsenosides 대사체)는 T-type 칼슘 채널을 강력하게 억제하는 것으로 나타났으나, M4 (protopanaxatrol ginsenosides 대사체)는 모든 칼슘 채널 subtypes에 효과가 없는 것으로 나타났다. 진세노사이드 Rg₃, Rh₂ 및 compound K는 칼슘 채널의 steady-state activation에는 탈분극 방향(depolarizing direction)으로 이동시키는 영향을 미치지 않지만 steady-state inactivation에는 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과들은 생체내에 존재하는 여러 칼슘 채널에 주요 조절 진세노사이드는 Rg₃, Rh₂ 및 compound K인 것으로 보인다(Lee 등, 2006).

지금까지의 연구 결과들은 진세노사이드가 여러 종류의 칼슘 채널 subtype를 조절하지만 정확하게 칼슘 채널의 어느 위치의 어떤 아미노산 상호 작용하는가에 대하여는 아직 밝혀진 바 없다. Choi (2009) 등은 L-type 칼슘 채널을 진세노사이드가 조절하는 데 있어서 칼슘 채널의 어떤 domain의 어떤 segment에 존재하는 아미노산과 상호 작용하는 지를 연구하

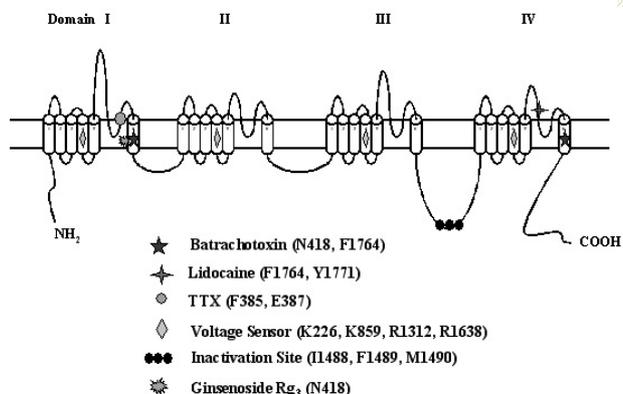


그림 3. 전압 의존성 Na^+ 이온 통로는 네 개의 domain으로 구성되어 있고, 각각의 domain은 여섯 개의 segments로 되어 있는 분자량이 큰 단백질이다. Segment 4는 voltage sensor를 구성하고, Segment 5-6은 Na^+ 이온의 흐름을 관장하는 채널 pore을 형성하는 것으로 알려져 있다. 각종 약물 및 독소들의 결합자리에 해당하는 아미노산들이 표시되어 있다.

였다. 칼슘 채널은 소듐 채널과 채널 구조에 많은 유사성을 가지고 있어서 Choi (2009) 등은 소듐 채널에서 진세노사이드가 결합 상호 작용하는 부위와 유사한 위치의 칼슘 채널 부분들을 돌연 변이 [Leu427를 Leu427Arg로, Asn428를 Asn428Arg로, Leu431를 Leu431Lys로, 이 위치들은 소듐 채널의 domain I segment 6 (IS6) 등과 유사성을 가지는 곳이다] 시킨 다음 진세노사이드의 작용을 연구하였다. 연구 결과, 흥미로운 것은 다른 수용체 혹은 이온 통로와는 달리 진세노사이드의 작용을 거의 소멸되는 것이 아니라 단순히 dose-response curves를 오른쪽으로 이동시키는 것으로 나타났다. 즉 wild-type에 비하여 IC_{50} 값이 3-4배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과는 소듐 채널과 칼슘 채널이 유사성이 있더라도 진세노사이드의 칼슘 채널에서의 인식 및 상호 작용 위치는 소듐 채널과 다를 수 있음을 보여 주고 있다.

(3) Voltage-gated K^+ channel (Kv)

이 이온 통로는 voltage-gated Ca^{2+} 및 Na^+ channels과는 달리 하나의 domain이 4개 모여서 온전한 voltage-gated K^+ channels (Kv)을 형성하고, 신경 세포와 같은 흥분성 세포들에 존재한다(그림 3). 이 채널(이온 통로들)은 voltage-gated Na^+ channels의 활성화에 따른 내향성 전류(inward currents)에 의한 흥분성 세포들의 탈분극 되어 막 전위(membrane potential)가 positive direction으로 전환될 때 외

향성 전류를 유발 (outward currents)하여 막 전위가 재분극 (repolarization)되도록 하는 데 관여 한다. Kv channels의 종류는 지금까지 밝혀진 바에 의하면 약 80여종이 되는 것으로 보고 되고 있다 (Hille, 2001). 이러한 역할들은 신경세포에서 신경전달 물질 방출 등 다양한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이 이온 통로의 기능은 신경 전달 물질 및 호르몬 방출 조절, 신경세포의 흥분성 조절, 심장 수축 속도 및 근육 세포 수축 조절 등 다양한 것으로 알려져 있다.

진세노사이드 Rg₃ epimers에 의한 voltage-gated K⁺channels의 조절에 대한 연구로는 처음 20(S)-ginsenoside Rg₃는 Kv1.4 및 Kv4.2 channel activity를 억제하지만 20(R)-ginsenoside Rg₃는 이들 채널에 전혀 효과가 없는 것으로 나타나 진세노사이드 Rg₃에 의한 Kv channels의 조절은 stereospecific manner로 작용함을 보여주고 있다 (Jeong 등, 2004). 이러한 연구 결과들은 20(S)-ginsenoside Rg₃가 Kv1.4 channel을 조절하는데 있어서 Kv1.4 channel과 상호 작용 하는 위치가 존재한다는 가능성을 보여주고 있다. Kv1.4 이온 통로가 가지고 있는 성질중의 하나는 세포막 K⁺ 농도를 증가시킬 경우 K⁺ activation이라는 현상이 유도되는데, 이 K⁺ activation을 시키고 나서 진세노사이드를 처리할 경우 진세노사이드 조절 효과가 세포막의 K⁺ 농도를 증가시킬수록 점차 줄어드는 것으로 나타났다. 이 K⁺ activation에 관여하는 아미노산들이 있는데, 이 아미노산들중 포타슘 채널의 531번째 존재하는 lysine이 존재한다. 이 lysine (Lys)의 위치는 Kv1.4 이온 통로의 pore에 바로 들어가기 전 (pore entryway)에 위치하고 있다. Lysine을 tyrosine (Tyr)으로 돌연변이 (즉, Lys531Tyr로 돌연변이 시킴) 시킬 경우 K⁺ activation도 소멸되고 동시에 진세노사이드에 의한 Kv1.4 이온 통로 조절 작용이 없어지는 것으로 나타났다. 흥미로운 것은 Lys531은 또한 포타슘 이온 통로 차단제인 tetraethylammonium (TEA)가 세포막에 결합하는 자리인 것으로 알려져 있다

Lee등은 (2008) 또한 진세노사이드와 Kv1.4 이온 통로가 서로 어떤 방식으로 결합되어 있는가를 3차원적인 docked modeling을 통하여 확인한 연구 결과를 보여주었는데 이 결과를 보면 진세노사이드 Rg₃의 당 부분과 골격 부분의 역할이 어떤가를 보여 주고 있다. 즉 wild-type Kv1.4 channel에서 진세노사이드 Rg₃의 첫 번째 당은 Lys531과 두개의 수소 결합

(hydrogen bond)을 형성하는 것으로 나타났고, 두 번째 당은 Lys531과 한 개의 수소 결합을 이루고 있는 것으로 나타났다. 또 두 번째 당이 Thr505에 하나의 수소 결합을 이루는 것으로 나타났고, His507은 첫 번째 당과 하나의 수소 결합과 두 번째 당과 또 하나의 수소 결합을 형성하여 총 여섯 개의 수소 결합을 형성하는 것으로 나타났다. 이에 반하여, Lys531Tyr Kv1.4 channel의 경우에는 돌연 변이된 Tyr531에 진세노사이드 Rg₃의 두 번째 당이 하나의 수소 결합을 이루고 있고, His507에 진세노사이드 Rg₃가 하나의 수소 결합을 하나 형성하는 것으로 나타나 총 2개의 수소 결합만이 돌연변이 Kv1.4 channel에서 이루고 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 wild-type Kv1.4 channel에서는 6개의 수소 결합을 형성하여 진세노사이드 Rg₃와 채널간의 결합을 이루고 있으나, 돌연변이가 될 경우 수소 결합 수가 2개로 줄어들어 진세노사이드 Rg₃와 Kv1.4 channel간의 결합력이 떨어져 진세노사이드 Rg₃에 의한 Kv1.4 channel 조절 능력이 없어지는 것으로 생각된다.

3차원적인 docked modeling을 통하여 새롭게 나타난 또 다른 발견은 진세노사이드 Rg₃의 골격 (backbone) 부분이 Kv1.4 channel pore를 물리적으로 막고 있는 것으로 나타났고, 이와는 대조적으로 돌연 변이 Lys531 Kv1.4 channel의 경우에는 돌연 변이로 인하여 이온 통로의 형태 (conformation)의 변환을 통하여 진세노사이드 Rg₃의 골격 (backbone) 부분이 Kv1.4 channel pore를 물리적으로 막고 있는 작용이 없어진다는 것이다 (Lee 등, 2008).

지금까지의 결과를 요약하면, 진세노사이드 Rg₃를 Kv1.4 이온 통로가 expression된 이온 통로에 처리하면, 진세노사이드 Rg₃의 당들은 Kv1.4 channel의 Lys531이 있는 pore입구 (pore entryway)에서 Lys531를 포함하는 Thr 및 His과 수소 결합을 형성하여 이온 통로 단백질과 안정된 결합하게 되고, 이때 진세노사이드 Rg₃의 골격 부분 (aliphatic side chain 포함)이 이온 통로의 pore를 막아서 K⁺의 흐름을 차단하거나 줄여준다고 생각할 수 있다 (Lee 등, 2009). 그러나, 돌연 변이 Kv1.4 이온 통로의 경우에는 진세노사이드 Rg₃에 부착된 당들과 이온 통로간에 수소 결합이 제대로 일어나지 않아 진세노사이드 Rg₃와 Kv1.4 이온 통로간에 감소된 수소결합이 만들어지기 때문에 진세노사이드 Rg₃에 의한 Kv1.4 channel 조절 능력 소실되는 것으로 생각된다.



III. 진세노사이드 구조와 생리활성 연관성, 이온 통로 및 수용체 인식 및 상호 작용 위치 확인 요약

지금까지 밝혀진 생리활성을 지닌 모든 약물들은 세포막 특정 단백질 혹은 세포질에 존재하는 특정 단백질과 결합 상호 작용을 통하여 그들의 생리학적 혹은 약리학적 효과 및 효능을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 본 고찰을 통하여 진세노사이드도 세포에서 진세노사이드 Rg₃ 자신의 작용을 발휘하기 위하여 주로 신경계에 존재하는 여러 종류의 세포막 단백질들과 상호 작용함을 *Xenopus oocytes*를 이용한 유전자 발현 (gene expression)과 돌연변이 기법 (site-directed mutagenesis)을 통하여 증명하였다. 흥미로운 것은 진세노사이드 Rg₃는 다른 약물들(ligands)과 같은 특징들을 가지고 있는 것으로 나타났다. 첫째, 진세노사이드 Rg₃는 수용체 및 이온 통로를 조절하는데 있어서 세포막에서 작용하여 그 효과를 발휘하고, 두 번째, 진세노사이드 Rg₃의 stereoisomer 양식으로 작용하고, 당 부분은 진세노사이드 Rg₃와 상호 작용하는 단백질들과 수소 결합을 형성하는 데 포함되어 있고, aliphatic side chain은 진세노사이드 작용을 강화시키거나 없애지게 하는데 관여하는 것으로 나타났다. 두 부분 (예, aliphatic side chain 및 당 부분)의 modifications은 인삼의 세포막 단백질 결합 능력을 강화시키거나 진세노사이드의 작용을 더 세게 하는데 활용될 수 있는 가치를 가지고 있다. 세 번째, 진세노사이드 Rg₃는 다양한 ligand-gated ion channels 및 이온 통로들을 인식/상호 작용하는 특별한 자리가 존재한다는 것이다. 이러한 자리에 진세노사이드의 작용은 아마도 인삼의 다양한 효능과 연관이 있는 것으로 생각된다. 이들 상호 작용 위치는 이온 통로 pore 안쪽(5-HT₃ 및 α7 nicotinic acetylcholine receptors), pore 입구 (pore entryway) (Kv1.4 channel), 혹은 pore를 형성하는 segment 부위에 결합 작용하는 것으로 나타났고 (Ca²⁺ 및 Na⁺ channels), 또한 이들 위치는 다른 약물들 (알코올 등) 이나 독소 (BTX)가 작용하는 부위이기도하다. 따라서 진세노사이드는 일종의 ligand로서 다른 약물들이 작용하는 자리들을 공유하여 그 효과를 발휘함을 보여주고 있다.

IV. 진세노사이드 생체막 단백질 인식 및 상호 작용 위치 확인을 통한 진세노사이드의 응용

예부터 인삼은 정신을 맑게 하고, 마음을 안정시키는 작용

이 있는 것으로 알려지고 있다. 지금까지 진세노사이드가 작용하는 원리를 살펴보면 신경계 및 심혈관계에 존재하는 여러 종류의 소듐 및 칼슘 이온들의 억제, 신경계 및 흥분성 세포들의 흥분성 증가시켜주는 ligand-gated ion channels (5-HT₃, nicotinic acetylcholine, NMDA receptors)의 억제하는 것으로 보아 신경계 및 심혈관계의 과도한 흥분을 줄여주고, 정상적인 경우에는 아무런 영향이 없더라도, 신경계 (예, brain ischemia)의 손상이나 심혈관계 (예, hypertension)의 기능 이상으로 항상성 유지가 어려울 때에 신경계나 심혈관계 손상을 악화시킬 수 있는 각종 흥분성 신경 전달물질 (glutamate)이나 호르몬으로부터 신경계 및 심혈관계 (아드레날린)를 보호해주는 역할을 할 것으로 생각된다 (Kim 등, 2004; Kim 등, 2005a; Kim 등, 2006; Kim 등, 2007). 신경계 및 심혈관계에서 발견된 상호 작용 외에도 진세노사이드는 다양한 종류의 세포 및 장기에 작용하는 것으로 알려져 있기 때문에 지금까지 발견된 상호 작용 외에도 아직 발견되지 자리가 더 있을 것으로 생각된다. 미래 연구에서 이러한 자리들이 밝혀지리라고 생각된다.

3. 결론

지금까지 진세노사이드 Rg₃를 대표 성분으로 하여 구조와 생리활성의 연관성 및 진세노사이드 Rg₃와 gene expression과 돌연변이 방법들을 활용하여 세포막 단백질들과의 상호 작용 위치 확인에 대한 지금까지 연구 발표된 내용들을 중심으로 살펴 보았다. 그 결과 진세노사이드가 어떻게 다양한 수용체와 이온 통로에 상호 작용함을 밝혀내었다. 그러나, 진세노사이드가 세포막 단백질들과 상호 작용하는 1st messenger로서 즉 리간드로서 작용하여 각종 수용체나 이온 통로를 조절할 수는 있으나, 지금까지 알려진 신경전달물질들, 호르몬들 및 각종 성장인자 (growth factors)들과 같이 2nd messenger의 생성 자극 혹은 생성 억제에는 영향이 없는 것으로 보인다. 더욱이 진세노사이드가 effector systems에 미치는 영향은 아직 발견되지 않고 있다. 이점들이 진세노사이드와 신경전달물질들, 호르몬들 및 각종 성장인자 (growth factors)들과의 차이점인 것으로 생각된다. 미래 연구에서는 1st messenger로서 낮은 농도의 진세노사이드가 그 효과를 잘 발휘할 수 있는 진세노사이드

유도체 및 지금까지 연구된 세포막 수용체 및 이온 통로들 각각에 대하여 좀더 선택적으로 작용할 수 있는 특정한 진세노사이드 유도체들을 합성하여 얻을 경우 인삼 및 진세노사이드의 활용에 있어서 부가가치가 증대에 크게 기여할 것으로 생각된다.

references
참고문헌

1. Choi S, Jung SY, Kim CH, Kim HS, Rhim H, Kim SC, and Nah SY. (2001) Effect of ginsenosides on voltage-dependent Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells. *J of Ethnopharmacol.* 74, 75-81.
2. Choi S, Jung, SY, Lee JH, Sala F, Engel AG, and Nah SY. (2002) Effect of ginsenosides, active components of ginseng, on nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J Pharmacol.* 442, 37-45
3. Choi SH, Lee JH, Pyo MK, Lee BH, Shin TJ, Hwang SH, Kim BR, Lee SM, Oh JW, Kim HC, Bae CS, Rhim H, Nah SY. (2009) Mutations Leu427, Asn428, and Leu431 residues within transmembrane domain-I-segment 6 attenuate ginsenoside-mediated L-type Ca²⁺ channel current inhibitions. *Biol Pharm Bull.* 32, 1224-1230.
4. Hille, B, (2001) Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc, *Sunderland, MA*
5. Jeong SM, Lee JH, Kim JH, Lee BH, Yoon IS, Lee JH, Kim DH, Rhim H, Kim Y, Nah SY. (2004) Stereospecificity of ginsenoside Rg₃ action on ion channels. *Mol Cells.* 31, 18, 383-389.
6. Kang DI, Lee JY, Yang JY, Jeong SM, Lee JH, Nah SY, Kim Y. (2005) Evidence that the tertiary structure of 20(S)-ginsenoside Rg₃ with tight hydrophobic packing near the chiral center is important for Na⁺ channel regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 333, 1194-2001.
7. Kim JH, Hong YH, Lee JH, Kim DH, Nam G, Jeong SM, Lee BH, Lee SM, Nah SY. (2005a) A role for the carbohydrate portion of ginsenoside Rg₃ in Na⁺ channel inhibition. *Mol Cells.* 19, 137-142.
8. Kim JH, Kim S, Yoon IS, Lee JH, Jang BJ, Jeong SM, Lee JH, Lee BH, Han JS, Oh S, Kim HC, Park TK, Rhim H, Nah SY. (2005) Protective effects of ginseng saponins on 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration in rats. *Neuropharmacology.* 48, 743-756.
9. Kim JH, Lee JH, Jeong SM, Lee BH, Yoon IS, Lee JH, Choi SH, Kim DH, Park TK, Kim BK, Nah SY. (2006) Stereospecific effects of ginsenoside Rg₃ epimers on swine coronary artery contractions. *Biol Pharm Bull.* 29, 365-370.
10. Kim JH, Cho SY, Lee JH, Jeong SM, Yoon IS, Lee BH, Lee JH, Pyo MK, Lee SM, Chung JM, Kim S, Rhim H, Oh JW, Nah SY. (2007) Neuroprotective effects of ginsenoside Rg₃ against homocysteine-induced excitotoxicity in rat hippocampus. *Brain Res.* 1136, 190-199.
11. Kim S, Kim T, Ahn K, Park WK, Nah SY, Rhim H. (2004) Ginsenoside Rg₃ antagonizes NMDA receptors through a glycine modulatory site in rat cultured hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 323, 416-424.
12. Lee BH, Jeong SM, Ha TS, Park CS, Lee JH, Kim JH, Kim DH, Han JS, Kim HC, Ko SR, Nah SY. (2004) Ginsenosides regulate ligand-gated ion channels from the outside. *Mol Cells.* 18, 115-121.
13. Lee BH, Lee JH, Lee SM, Jeong SM, Yoon IS, Lee JH, Choi SH, Pyo MK, Rhim H, Kim HC, Jang CG, Lee BC, Park CS, Nah SY. (2007) Identification of ginsenoside interaction sites in 5-HT_{3A} receptors. *Neuropharmacology* 52, 1139-1150.
14. Lee BH, Lee JH, Yoon IS, Lee JH, Choi SH, Shin TJ, Pyo MK, Choi WS, Lee SM, Lim Y, Rhim H, Nah SY. (2007) Mutations of arginine 222 in pre-transmembrane domain I of mouse 5-HT_{3A} receptor abolish 20(R)- but not 20(S)-ginsenoside Rg₃ inhibition of 5-HT-mediated ion currents. *Biol Pharm Bull.* 30, 1721-1726.
15. Lee BH, Choi SH, Pyo MK, Shin TJ, Hwang SH, Kim BR, Lee SM, Lee JH, Lee JH, Lee HS, Choe H, Han KH, Kim HC, Rhim H, Yong JH, Nah SY. (2009) A role for Leu247 residue within transmembrane domain 2 in ginsenoside-mediated alpha7 nicotinic acetylcholine receptor regulation. *Mol Cells.* 27, 591-599.
16. Lee JH, Jeong SM, Kim JH, Lee BH, Yoon IS, Lee JH, Choi SH, Kim DH, Rhim H, Kim SS, Kim Ji, Jang CG, Song JH, Nah SY. (2005) Characteristics of ginsenoside Rg₃-mediated brain Na⁺ current inhibition. *Mol Pharmacol.* 68, 1114-1126.
17. Lee JH, Jeong SM, Kim JH, Lee BH, Yoon IS, Lee JH, Choi SH, Lee SM, Park YS, Lee JH, Kim SS, Kim HC, Lee BY, Nah SY. (2006) Effects of ginsenosides and their metabolites on voltage-dependent Ca²⁺ channel subtypes. *Mol Cells.* 21, 52-62.
18. Lee JH, Choi SH, Lee BH, Yoon IS, Shin TJ, Pyo MK, Lee SM, Rhim H, Park MH, Park TY, Nah SY. (2008) Modifications of aliphatic side chain of 20(S)-ginsenoside Rg₃ cause an enhancement or loss of brain Na⁺ channel current inhibitions. *Biol Pharm Bull.* 31, 480-486.
19. Lee JH, Lee BH, Choi SH, Yoon IS, Shin TJ, Pyo MK, Lee SM, Kim HC, Nah SY. (2008) Involvement of batrachotoxin binding sites in ginsenoside-mediated voltage-gated Na⁺ channel regulation.



- Brain Res. 1203, 61-67.
20. Lee JH, Lee BH, Choi SH, Yoon IS, Pyo MK, Shin TJ, Choi WS, Lim Y, Rhim H, Won KH, Lim YW, Choe H, Kim DH, Kim YI, Nah SY. (2008) Ginsenoside Rg₃ inhibits human Kv1.4 channel currents by interacting with the Lys531 residue. *Mol Pharmacol.* 73, 619-626.
21. Lee JH, Choi SH, Lee BH, Shin TJ, Pyo MK, Hwang SH, Kim BR, Lee SM, Bae DH, Rhim H, Nah SY. (2009) The effects of ginsenoside Rg₃ on human Kv1.4 channel currents without the N-terminal rapid inactivation domain. *Biol Pharm Bull.* 32, 614-618.
22. Limbird LE (2004) The receptor concept: a continuing evolution. *Mol Interv.* 4, 326-336
23. Nah, SY. and McCleskey, WE. (1994) Ginseng root extract inhibits calcium channels in rat sensory neurons through a similar path, but different receptor, as μ -type opioids. *J. Ethnopharmacol.* 42, 45-51.
24. Nah, SY, Park, HJ, and McCleskey, EW. (1995) A trace component of ginseng that inhibits Ca²⁺ channels through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 92, 8739-8743.
25. Nah, SY. (1997) Ginseng : Recent Advances and Trends. *Korean J. Ginseng Sci.* 21. 1-12.
26. Rang HP (2004) The receptor concept: Pharmacology's big idea. *Br. J. Pharmacol.* 147, S9-S16