

아주까리 種子의 毒性 蛋白質 “Ricin”

船 津 勝

九州 大學 명예 교수

熊本 工業 大學 교수

日 本

◆ Review ◆

Toxic Protein “Ricin” of *Ricinus communis*

Masaru Funatsu

Emeritus Professor of Kyushu University

Professor of The Kumamoto Institute of Technology

Japan

아주까리 (*Ricinus communis* L.) 種子에는 오래전 부터 毒性 物質로서 알카로이드 化合物인 “Ricinin” 이외에 热에 不安定한 化合物로서 經口 毒性이 強한 物質인 “Ricin”이 알려져 왔으나 19세기 말까지 그 本體에 대하여 잘 알려져 있지 못했다.

1905년 Osborne 등이 一般 蛋白質 分離 方法을 사용하여 Ricin을 分離하여 이를 蛋白質로 推定한 후 이의 检定을 행한 결과 (Karrer 등, 1920) 이 蛋白質에 결합되어 있을 수 있는 低分子 毒性 成分의 分離를 시도하였으나 이들 低分子 化合物이 結合되어 있지 않음을 보고 Ricin이 毒性 物質 本體 (toxic principle)로서 蛋白質임을 再 確認하였다.

이후 20여년 간 Ricin에 관한 연구가 별로 이루어지지 않다가 1947년 이후 면역학과의 관련으로 이의 정체 및 성질에 관한 연구가 진행되기 시작하였다. Kabat (1947)는 Ricin 제품을 분리 정제한 후 이를 Ricin B₁이라 불렀으며 이것이 赤血球 凝集活性 (hemagglutination activity)을 나타내는 것으로 보아 이의 毒作用은 赤血球를 凝集시키는 결과로 생각하였다.

이어서 Kunitz와 McDonald (1948)는 Ricin을 結晶 製品으로 얻었으며 强한 赤血球 凝集活性을 나타내었으

나 이 結晶品은 單一 蛋白質이 아니고 적어도 2種 以上의 蛋白質 複合體로 되어 있는 不均一한 것임을 알았다. 또한 LeBreton 및 Moulé (1951)은 Ricin 製品을 分離하여 바로 Ricin T_b라 명명하였으며 이 제품은 結晶化되지 않고 不定形이었으나 Kunitz의 結晶 Ricin과 同等한 毒性을 나타냄과 동시에 T_b는 强한 蛋白質 分解力を 나타냄을 발견하므로서 이들도 Ricin의 本體 (nature of toxin)은 特殊 蛋白質 分解 酶素라고 推定하였다.

이상과 같이 1960년까지는 Ricin이 毒性 蛋白質이긴 하지만 그 本體가 赤血球 凝集素 (hemagglutinin)인지 蛋白質 分解 酶素 (protease)인지 確實하지 않았다. 그 理由를 Ricin의 精製が 完全하지 못하였기 때문이라고 생각하여 本人들은 우선 Kunitz등의 結晶 Ricin 및 Ricin T_b를 더욱 精製하여 Ricin C₁을 分離하였다 (1960).

이결과 Ricin C₁은 赤血球 凝集活性 및 蛋白質 分解 酶素活性을 전혀 갖고 있지 않음에도 불구하고 强한 毒性을 나타내었다. 따라서 Ricin의 毒性은 赤血球 凝集 및 蛋白質 分解 酶素活性과는 關係가 없는 것으로 판명되었다. 그러나 Ricin C₁은 Kunitz의 結晶 Ricin을 더욱 精製한 것임에도 불구하고 毒性的 增加를 보여주지 않았으므로 아주까리 種子로부터 Ricin의 分離精製

* 본 원고는 1979. 5. 26 연세 대학교에서 개최한 한국 식품 과학회 제22차 정기 총회 및 학술 강연회에서 실시한 특별 강연의 원고를 서울 여자 대학 金炳默 교수께서 번역한 전문이다.

* This paper was presented at the 22nd Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology on May 26, 1979, which was held at Yonsei University, Seoul, Korea. The original paper in Japanese was kindly translated by Professor Byung Mook Kim of Seoul Women's College

를 새로 험하였다.

1967년 Ishiguro 등은 이온교환 chromatography에 의하여 精製를 행하고 얻은 製品을 Ricin D라고 하였다. Ricin D는 10^{-6} M Ca²⁺ 농도 존재 하에서 结晶화되었으며 分子量은 60,000의 糖蛋白質(glycoprotein)으로서 중래의 结晶 Ricin, Ricin T_b 및 C₁보다 10배의 毒性을 가졌으며 MLD₄₈ (48時間 以內에 mouse를 죽이는데 필요한 mouse 體重 g당 最小 Ricin N量)은 腹腔内 注射에 의하여 0.001 µg N이었다. 이 毒性은 腹腔内 注射에 依하여 1 g으로 體重이 60 kg인 사람 약 2000人을 致死시킬 수 있는 強한 毒性인 것이다.

¹³¹I을 標識한 Ricin D를 사용하여 臟器 特異性을 조사한 결과 Ricin D는 肝臟을 特異的으로 침해하여 즉 음에 이르도록 하는 것이 밝혀졌다. 또한 이는 一種의 代謝毒으로서 一定한 潜伏 期間을 갖고 있음이 알려졌다. 앞서 언급한 바와 같이 Ricin D는 6.25 %의 糖을 함유하는 糖蛋白質로서 그의 아미노산 및 糖組成은 Table 1에 표시한 바와 같다.

Table 1. Amino acid composition of Ricin D and its subunits

Amino Acid	Number of residues		
	Ricin D	Ile-chain	Ala-chain
Aspartic acid	64	26	38
Threonine	38	17	21
Serine	40	18	22
Glutamic acid	56	29	27
Proline	28	15	13
Glycine	39	17	22
Alanine	40	24	16
$\frac{1}{2}$ Cystine	13	2	11
Valine	32	15	17
Methionine	6	3	3
Isoleucine	38	22	16
Leucine	46	22	24
Tyrosine	22	14	8
Phenylalanine	19	14	5
Lysine	9	2	7
Histidine	6	3	3
Arginine	35	20	15
Tryptophan	9	2	7
Total	540	265	275
Mannose	17	4	13
Glucosamine	6	2	4
M. W.	64,000	31,000	33,000

Table 1에서 보는 바와 같이 Ricin D는 약 540개의 아미노산 殘基와 17개의 mannose, 6개의 glucosamine (N-acetylglucosamine)으로構成되어 있다. 末端 아미노산 分析結果 N-末端基로서 Ala 및 Ile, C-末端基로서 Ser 및 Phe, 각각 2개의 아미노산 残基가 Ricin D 1 mole당 1 mole씩 檢出되었다. 이結果에 의하면 Ricin D는 2개의 polypeptide鎖로構成되어 있는 것이 밝혀졌다. 이 2개의 polypeptide鎖는 따라서 N-末端基 아미노산 이름에 따라 "Ala鎖", "Ile鎖"라 부른다. 이 2개의 polypeptide鎖는 1개의 disulfide結合(-S-S-結合)에 의하여 連結되어 있으며 따라서 이 -S-S-結合을 적당한 方法으로 還元시킨 다음 DEAE-cellulose 크로마토그라피를 행하면 각각의 Ala鎖와 Ile鎖로 分離된다.

Ala鎖와 Ile鎖는 Table 1에서 알 수 있는 바와 같이 아미노산組成과 糖組成이 달라 Ricin D 1 mole당 Ile鎖는 265개의 아미노산 残基, mannose 4 moles, glucosamine 2 moles였으며, Ala鎖는 275개의 아미노산 残基, 13 moles의 mannose, 4 moles의 glucosamine로 구성되어 있는異種의 polypeptide이나 分子量은 거의 비슷한 30,000 (Ile鎖, 31,000, Ala鎖 33,000)이었다.

兩鎖에 있어서 糖의結合狀態를 보면 모두 oligosaccharide로서 Ricin 중의 asparagine殘基에結合되어 있고 Ala鎖에는 두곳에, Ile鎖에는 한곳에 糖成分이結合되어 있었다. Fig. 1에 Ricin D의結合狀態를 보여 준다.

Ala鎖와 Ile鎖는 二次構造에 있어서도 서로 달라 Ala鎖는 약 1/4이 α -helix構造(螺旋狀構造)인 반면 Ile鎖는 α -helix를 거의 함유하지 않고 polypeptide鎖波狀으로 배열된 β -構造이다.

Ricin D의 毒性은 disulfide結合을 끊을 경우 현저히 저하된다. Ala鎖單獨으로는 毒性을 나타내지 못하며 Ile鎖만은 Ricin D의 약 1/70의 毒性을 나타낸다. 따라서 Ricin의 毒性은兩鎖가 disulfide結合에結合된 상태이어야 나타난다. 이理由는 다음에 설명하는 바와

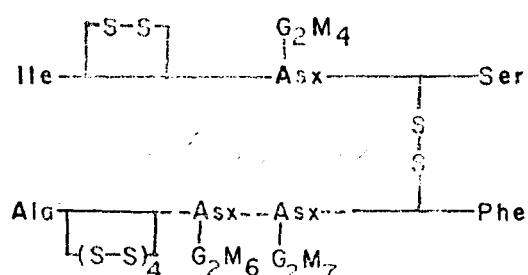


Fig. 1. A schematic structure of Ricin D

Table 2. Cytoagglutinating activity of Ricin D and its subunits

Protein	Protein concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
	4	7	8	10	20	65	100	200	300
Ricin D	-	-	±	+	#+	#+	#+	#+	#+
+ 0.2 M Glucose	-	-	±	+	#+	#+	#+	#+	#+
+ 0.2 M Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ 0.2 M Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ 0.2 M N-Ac-galactosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_0 CM-Ala chain	-	±	+	#+	#+	#+	#+	#+	#+
+ 0.2 M Glucose	-	±	+	#+	#+	#+	#+	#+	#+
+ 0.2 M Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ 0.2 M Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ 0.2 M N-Ac-galactosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R_0 CM-Ile chain	-	-	-	-	-	-	-	-	-

같이兩鎖는 毒性을 나타내는데 있어서 각각 다른 역할을 가지고 있기 때문이라고 생각된다.

Ricin D는 sarcoma ascites tumor cell의增殖을阻止하고 이를凝聚시키는活性을 가지고 있다. Table 2에 Ricin D의細胞凝聚力(cytoagglutinating activity)을 표시하였다. Ricin D와同時에 Ala鎖도強한凝聚力を 나타내나 Ile鎖는凝聚力を 전혀 가지지 않는다. 이것은 Ricin D의凝聚力이 Ala鎖에 의해 나타나며 Ala鎖가細胞에結合하여凝聚을 일으키는作用을 하고 있음을 이야기해 준다.

따라서 Ala鎖單獨으로는 위에서 말한바와 같이毒性이 없지만 Ricin이毒性을 나타내는데 있어서 Ala鎖는 제1단계로서 필요한細胞와의結合作用을 하는 것으로 Ricin의結合部位(binding site) 또는細胞와結合하는蛋白質(binding protein)임을 알 수 있다. 이 Ala鎖의細胞와의結合은 Table 2에 표시한 바와 같이 galactose, lactose, N-acetylgalactosamine에 의해서阻止된다. 이들糖에의하여 sarcoma ascites tumor cell에 대한結合을阻止하면增殖阻止가 일어나지 않고毒性이 나타나지 않게 된다.

한편 Ricin毒性은細胞의蛋白質生合成을阻害하므로서 나타난다고 Olsnes(1972)등이 최근밝혔다. 이들은細胞膜을除去시킨細胞內(cell free系)에 있어서 Ricin D, Ala鎖 및 Ile鎖의毒性을조사한바 Ricin D와 Ile鎖가同等하게蛋白質生合成에대한阻害活性을 나타내었으나 Ala鎖는 아무런영향을주지 않았다. 이것은細胞膜이없으므로Ala鎖가細胞膜과結合할必要없이生合成系에直接作用하기때문이며生合成阻害活性은Ile鎖에의하여 나타남을보여준다. 즉 Ile鎖는Ricin의毒性部位(toxic site)혹은毒性蛋白質(toxic protein)으로作用하는것임을보여준다.

이상과같이 Ricin은2개의polypeptide가1개의disulfide結合에의하여연결된複合體로서이중구성polypeptide하나는結合蛋白質(binding protein)이고 다른하나의구성polypeptide는毒性蛋白質(toxic protein)으로서이두polypeptide가結合하여複合體를형성하였을때强한毒性을나타낸다.毒性蛋白質의이와같은構造는cholera toxin이나 diphtheria toxin과꼭같은것으로이미잘알려져있다.