

긴세노시드 Rb₂가 Guanylate Cyclase에 미치는 작용에 대한 GMP의 조절효과

서기림, 남정이*, 강영태**, 박인원**, 이윤영**
성심여자대학 화학과, *송전대학교 화학과, **서울대학교 화학과
(1986년 2월 7일 접수)

Regulatory Effects of GMP on the Action of Ginsenoside Rb₂ to the Activities of Guanylate Cyclase

Kih Lim Seo, Jeong E. Nam Shin,* Young Tae Kang**, Inwon Park**, and Youn Young Lee.**

Department of Chemistry, Song Sim College for Women,

** Department of Chemistry, Soong Jun University,*

*** Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul, Korea*

(Received November, 1985)

Abstract

Effects of various nucleotides including GMP, ginsenoside Rb₂, and redoxidants on the activities of both particulate and soluble guanylate cyclase from rat brain have been studied.

At the low concentrations of GMP, AMP, ADP, and ATP the activity of guanylate cyclase is not substantially affected, whereas the inhibitory effects of these nucleotides on the enzyme activities are increased with the increasing concentrations of the nucleotides. Similarly, the activity of the soluble guanylate cyclase is inhibited with the increasing concentrations of the nucleotides.

Inhibitory effects of GMP, AMP, ADP, and ATP on the activities of particulate guanylate cyclase and soluble guanylate cyclase is reduced in the presence of ginsenoside Rb₂. It is apparent from this finding that there are separate binding sites on the guanylate cyclase molecule specific for nucleotides and for ginsenoside Rb₂.

NAD⁺ shows no significant effect on the activities of particulate guanylate cyclase, whereas NADH inhibits the activities of the enzyme. The activity of particulate guanylate cyclase is slightly inhibited by iodine, whereas that of soluble guanylate cyclase is strongly inhibited.

서 론

인삼의 현저한 효과중의 하나는 인체의 생리작용을 조절하여 항상성상태를 유지하는 것이다. 본 연구진은 생리작용의 조절메카니즘에 관여하는 adenylate cyclase와 guanylate cyclase에 미치는 몇 가지 긴세노시드들의 효과를 조사한 바 있는데, 그중 긴세노시드 Rb₂가 이 두 효소계에 대하여 상반적으로 조절한다는 것을 관찰하였다²⁾. cAMP와 cGMP가 체내의 항상성상태를 유지시키는 상반적인 조절인자들로서 작용한다는 Goldberg등³⁾의 음양설을 고려할 때, 몇 가지 인삼성분들이 adenylate cyclase와 guanylate cyclase 두 효소계에 대하여 상반적인 효과를 가지고 있다는 것은 매우 흥미있는 일이다. 또한 긴세노시드 Rb₂는 호르몬과 유사하게 D-1 dopamine receptor에 특이하게 결합한다는 것이 우리들의 실험으로 밝혀졌으며 사포닌의 이러한 호르몬 유사 작용이 GMP의 존재로 조절될 수 있다는 예비적 관찰을 하였다²⁾.

Adenylate cyclase system에 들어 있는 뉴클레오티드 결합단백질(N-단백질)에 GTP나 GDP와 같은 뉴클레오티드들이 결합하므로써 이 효소계의 활동성을 조절한다는 것은 잘 알려진 사실이지만⁴⁾, GMP와 같은 뉴클레오티드가 조절효과를 가진다는 것은 예상밖의 일이다. 본 연구에서는, 몇 가지 뉴클레오티드들이 쥐의 뇌에서 얻은 guanylate cyclase의 활동성에 주는 효과와 긴세노시드 Rb₂가 존재하는 조건에서 뉴클레오티드들이 guanylate cyclase에 주는 효과를 조사하였다.

또한 guanylate cyclase의 활동성이 여러가지 산화 환원제에 의해서 조절된다는⁵⁾ 보고도 있어서 요오드 그리고 NAD⁺와 NADH가 긴세노시드 Rb₂가 존재하는 조건에서 guanylate cyclase의 활동성에 미치는 효과도 조사해 보았다.

재료 및 방법

1. 재료

사용한 인삼은 6년생 마른 뿌리를 시장에서 구입하였다. guanylate cyclase를 제조하기 위한 쥐는 서울대학교 동물 사육장에서 공급받았다. 고리형 GMP의 분석키트는 영국의 Amersham 소재 Radiochemical Center사의 제조품을 사용하였다. ATP(이나트륨형) GTP(이나트륨형) 및 TLC용 실리카 겔은 독일의 Merck사에서 구입하였다. 테오피린(theophylline), 소의 혈청 알부민(bovine serum albumine), 디티오테이트(dithiothreitol), 크레아틴 인산(creatine phosphate), 크레아틴 포스포키나아제(creatine phosphokinase), AMP 등은 미국의 Sigma사에서 구입하였다.

2. 긴세노시드들의 추출과 분리

긴세노시드들의 추출은 Oura와 Shibada⁶⁾ 방법을 약간 변형한 것을 사용하였다. 분말상태의 인삼 약 100g을 약 300ml의 메탄올에 넣고 6시간 가열하면서 환류한 다음 여과한다. 거른액을 진공 증발하고 그 말린 물질을 100ml의 물에 녹인다. 이 용액에 약

100ml의 에테르를 첨가하여 30 분간 혼든다. 물층을 취하여 거기에다 40 내지 45 g의 황산 암모늄을 첨가한다. 이렇게 해서 얻은 침전물을 약 50ml의 물에 용해시켜서 그 용액을 3 일 동안 수도물로 투석시킨다. 투석주머니 안에 있는 용액을 동결 건조하여 적당한 양의 메탄올에 용해시킨 다음에 이것을 TLC법으로 분리하였다. TLC 판상에서 단일 표준 긴세노시드들과 함께 cochromatography하여 확인 하였다. 긴세노시드들의 표준화합물들은 서울대학교 생약연구소에서 기증받았다.

3. 입자상 및 가용성 guanylate cyclase의 제조

150 내지 200 g의 몸무게의 쥐를 단두법으로 죽였다. 가용성 guanylate cyclase의 제조는 Nakazawa와 Sano⁷⁾의 방법에 따라서 하였고, 입자상 guanylate cyclase의 제조는 Chrisman등⁸⁾의 방법에 따라서 하였다. 제조된 효소의 단백질 함유량의 측정은 Lowry 등⁹⁾의 방법에 따라서 하였다. 입자상 guanylate cyclase와 가용성 guanylate cyclase의 단백질 함유량은 각각 3.72mg/ml와 2.46mg/ml이었다.

4. 방사능 면역분석법에 의한 ⁶GMP의 정량—guanylate cyclase의 활동성의 분석

cGMP의 양은 Garbers와 Murad¹⁰⁾의 방법으로 측정하였다. 반응 혼합액은 Tris-HCl (50mM, pH 7.6), 크레아틴 키나아제 혼합액 (14ml에 3,600단위의 크레아틴 포스포키나아제, 75mM 인산 크레아틴을 녹인 용액) 10 μ l를 가하여 크레아틴 포스포키나아제의 양을 2.5 단위, 인산 크레아틴의 농도가 3.75mM가 되게 하고, 테오필린(10mM), GTP (0.2mM), 0.8mM MnCl₂와 효소액을 함유하였다. 긴세노시드 Rb₂의 효소에 대한 효과를 보기 위한 실험들에서는 적절한 양의 사포닌 용액을 첨가하여 최종 부피를 Tris-HCl 완충용액으로 200 μ l로 조절하였다. 대조실험에서는 사포닌 용액을 첨가함이 없이 반응 최종 부피를 Tris-HCl 완충용액으로 200 μ l로 조절하였다.

위의 반응 혼합액을 잘 흔들면서 37°C의 물중탕에서 10분간 방치하여 반응을 일으켰다. 반응은 50mM 초산나트륨(pH 4) 1.8ml를 반응 혼합액에 첨가하고 95°C 물중탕에서 3분간 가열함으로써 정지시켰다. 이때 생긴 변성된 단백질 침전물을 약 3,000 \times g에서 수분간 원심분리시키고 그 상등액을 cGMP 측정에 사용하였다.

100 μ l의 상등액에다 50 μ l의 ³H-GTP(8pmoles/ml, 0.16 μ Ci), 항혈청 용액 50 μ l를 Eppendorf 원심분리용 관에 넣고 수 초 동안 잘 흔들어 섞고, 4°C에서 1시간 반 동안 방치하여 평형에 도달하게 하였다. 다음에 얼음으로 냉각시킨 황산암모늄 용액 1ml를 첨가하여 잘 섞고 얼음물 속에서 5분간 방치하였다. 이 혼합물을 원심분리하여 상등액은 버리고, 침전물을 1.1ml의 물에 녹였다. 이것을 잘 흔들어서 완전히 녹인 다음 그 용액을 바 이알에 넣어서 방사능을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 몇 가지 뉴클레오티드들이 guanylate cyclase의 활동성에 미치는 효과

AMP, ADP, 및 ATP가 입자상 guanylate cyclase의 활동성에 주는 효과를 Fig. 1에

나타내었다. 뉴클레오티드들의 농도 범위는 10^{-2} ~10mM이다. AMP는 이 농도 범위에서

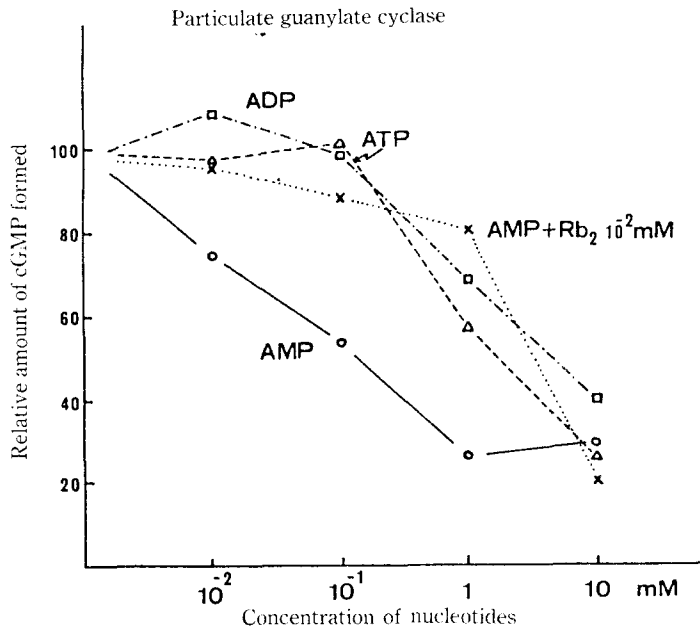


Fig. 1. Effects of AMP, ADP, and ATP on the particulate guanylate cyclase activity. Effects of AMP in the presence of ginsenoside Rb₂ is also shown.

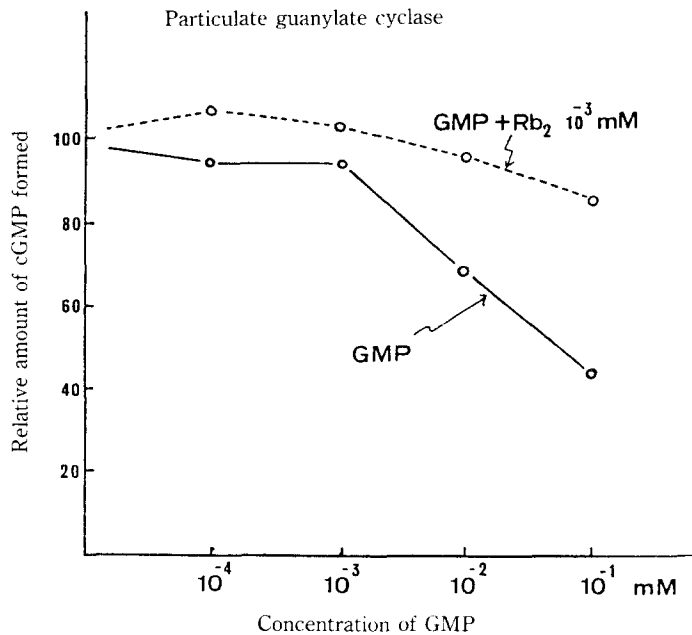


Fig. 2. Effects of GMP on the particulate guanylate cyclase activity in the presence of 10^{-3} mM ginsenoside Rb₂.

이 효소를 억제하였으며 1mM 농도에서 가장 많이 억제하였다. 이 농도에서 효소의 활동도는 대조실험에 비하여 30% 정도이었다. ADP는 10^{-2} mM 농도에서 효소의 활동도를 다소 증가시켰다. 농도가 더 증가함에 따라서 활동도는 점차 감소하였다. ATP는 낮은 농도에서는 효소의 활동도에 영향을 주지 않았으나 10^{-1} mM 농도 이상에서는 이 효소를 억제하였다. 이 결과들에서 쥐뇌에서 얻은 입자상 효소는 AMP, ADP 및 ATP등에 의해서 억제된다는 것을 알 수 있다.

이 뉴클레오티드들은 폐¹¹⁾, 심장¹²⁾, 간¹³⁾ 및 신장¹⁴⁾에서 얻은 guanylate cyclase의 활동도를 억제한다는 것이 보고되어 있다. adenylate cyclase 분자에 있는 뉴클레오티드 결합 단백질에 GTP가 결합하면 효소의 활동도가 증가하는 것¹⁵⁾과는 대조적으로 guanylate cyclase는 ATP가 결합하면 억제되었다. 따라서 ATP가 이 효소계의 한 조절인자로 작용한다는 것을 예상할 수 있으나 ATP가 뉴클레오티드 결합 단백질에 결합함으로써 이러한 효과를 내는 것인지 확실하지 않다.

GMP가 입자상 효소에 미치는 효과를 Fig. 2에 나타내었다. GMP는 낮은 농도범위에서 큰 영향을 미치지 않지만 10^{-3} mM 농도 이상에서는 이 효소를 많이 억제하였다. 가용성 guanylate cyclase에 미치는 GMP와 AMP의 효과를 Fig. 3과 Fig. 6에 나타내었다. GMP는 입자상 효소의 경우와 마찬가지로 가용성 효소에도 억제효과를 나타내주었으며 GMP의 농도가 10^{-1} mM 일 때 가장 많이 억제하였으며 대조실험에 비하여 활동도가 50% 정도로 감소하였다. AMP가 가용성 효소에 미치는 억제 효과는 비교적 적었으며 10^{-3} mM 일 때 가장 많이 억제하였다. 이때 효소의 활동도는 대조실험에 비하여 80% 정도이었다. AMP가 입자상 효소의 활동성을 30%로 감소 시키는 것에 비하면 가용성 효소에 대해서

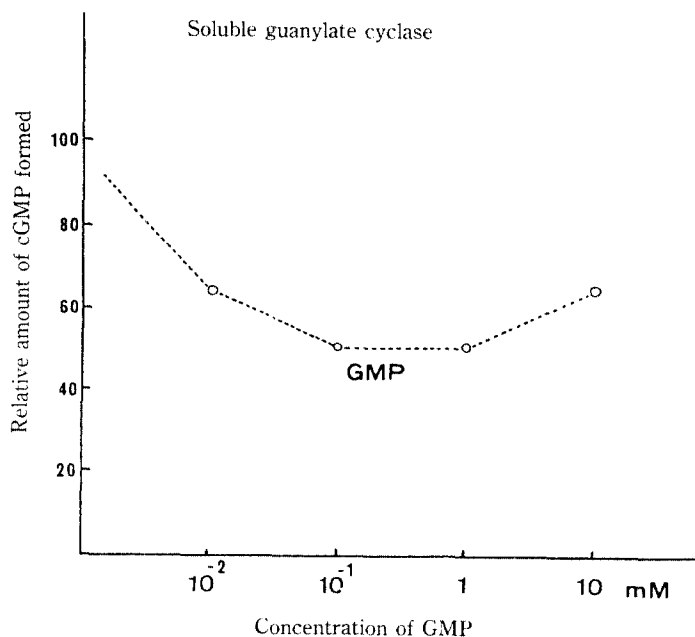


Fig. 3. Effects of GMP on the soluble guanylate cyclase activity.

는 억제 효과가 적다는 것을 알 수 있었다. 이 결과에서 입자상 guanylate cyclase와 수용성 guanylate cyclase의 물리적 및 화학적 성질이 다소 다를 것임을 추측할 수 있다.

2. 긴세노시드 Rb₂가 guanylate cyclase에 미치는 효과

긴세노시드 Rb₂가 단독적으로 존재할 때 guanylate cyclase계에 미치는 효과와 긴세노시드 Rb₂가 AMP와 함께 존재할 때 이 효소계에 미치는 효과의 변화를 관찰하였다. 또한 AMP가 단독으로 존재할 때와 여러 농도의 긴세노시드 Rb₂가 존재할 때 AMP가 미치는 효과의 변화를 비교하였다. 먼저 긴세노시드 Rb₂의 농도를 10⁻²mM로 일정하게 유지하고 AMP의 농도를 변화시키면서 입자상 guanylate cyclase의 활동도 변화를 조사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. AMP가 단독으로 존재할 때는 AMP 농도가 증가함에 따라서 입자상 효소의 활동도가 급격히 감소하였으나 긴세노시드 Rb₂가 10⁻²mM 존재할 때는 활동도가 완만한 감소를 보이다가 AMP 농도가 1mM 이상일 때에만 급격히 감소하였다. 즉 긴세노시드 Rb₂는 효소에 대한 AMP의 억제 효과를 감소시키는 것을 알았다. 반대로 AMP 농도를 일정하게 유지하고 긴세노시드 Rb₂의 농도를 변화시켰을 때 입자상 효소의 활동도의 변화를 Fig. 4와 Fig. 5로 나타내었다. Fig. 4는 AMP의 농도를 10⁻¹mM로 고정시키고 긴세노시드 Rb₂의 농도를 10⁻⁴mM에서 10⁻¹mM까지의 범위에서 변화시킨 경우이고 Fig. 5는 AMP의 농도를 1mM로 고정시키고 긴세노시드 Rb₂의 농도를 1mM에서 5mM까지의 범위에서 변화시켰을 때 입자상 효소의 활동도 변화를 나타낸 것이다. 이 두 결과는 긴세노시드 Rb₂의 억제 효과가 AMP의 존재로 인하여 감소된다는 것을 보여준다.

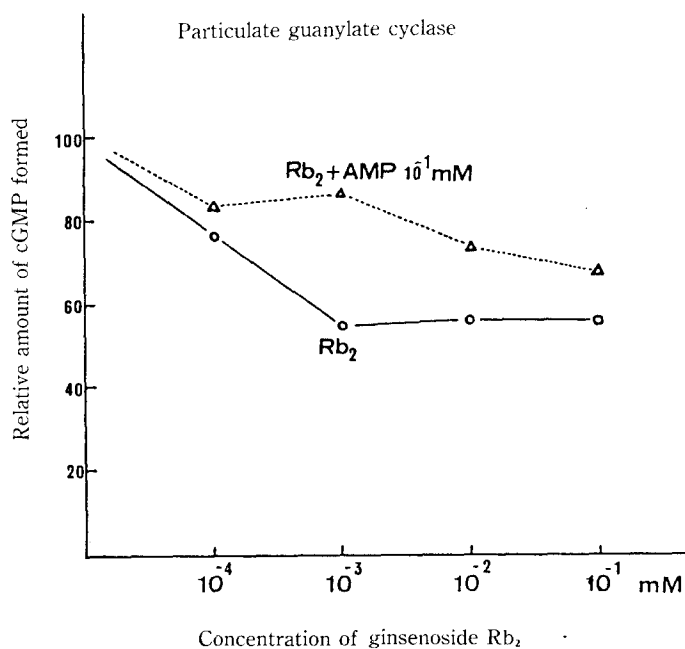


Fig. 4. Effects of low concentration of ginsenoside Rb₂ on the particulate guanylate cyclase activity in the presence of 10⁻¹ mM AMP.

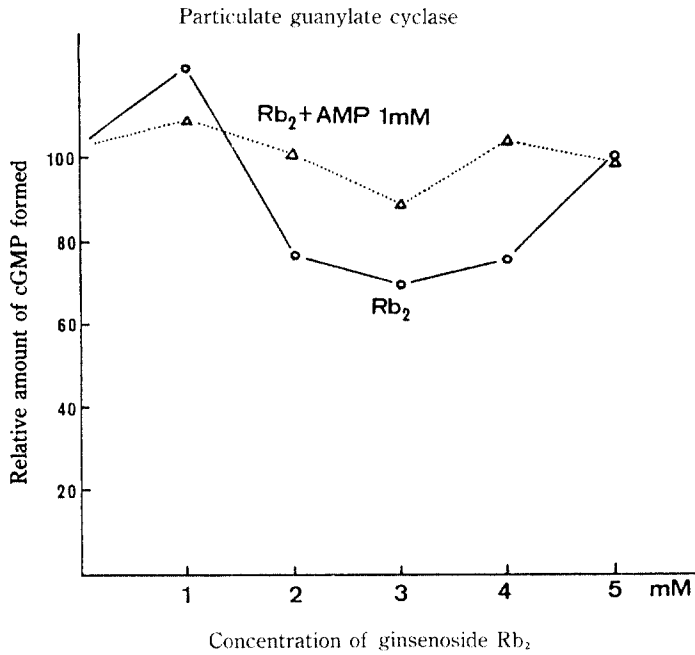


Fig. 5. Effects of high concentration of ginsenoside Rb₂ on the particulate guanylate cyclase activity in the presence of 1 mM AMP.

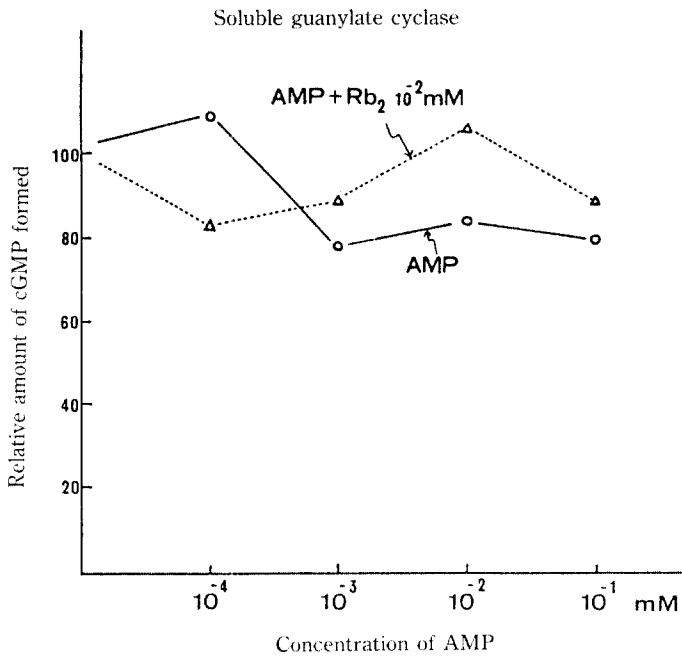


Fig. 6. Effects of AMP on the soluble guanylate cyclase activity in the presence of 10⁻² mM ginsenoside Rb₂.

긴세노시드 Rb₂의 농도를 10⁻²mM로 고정시키고 AMP의 농도를 10⁻⁴mM에서 10⁻¹mM까지의 범위에서 변화시켰을 때 가용성 guanylate cyclase의 활동도 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 10⁻⁴mM의 낮은 농도에서 AMP가 단독으로 존재할 때는 가용성 효소의 활동도를 다소 증가시켰으나 긴세노시드 Rb₂가 존재할 때는 AMP의 자극 효과가 다소 감소된다. AMP의 농도가 10⁻²mM로 증가하면 AMP의 억제효과가 긴세노시드 Rb₂의 존재로 인하여 감소하였다. 반대로 AMP의 농도를 10⁻³mM로 고정시키고 긴세노시드 Rb₂의 농도를 10⁻⁴mM에서 10⁻¹mM까지의 범위에서 변화시켰을 때 가용성 효소의 활동도 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 긴세노시드 Rb₂가 단독으로 존재할 때 10⁻⁴mM의 낮은 농도에서는 영향이 거의 없으나 10⁻³mM로 증가함에 따라서 효소의 활동도는 많이 억제되었다. 그러나 AMP가 10⁻³mM 존재할 때에는 긴세노시드 Rb₂의 억제 효과가 많이 감소하였다.

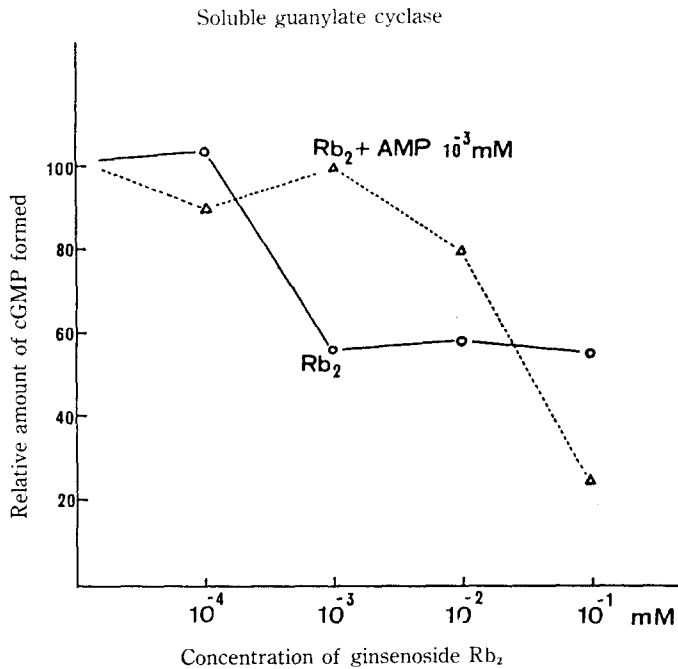


Fig. 7. Effects of ginsenoside Rb₂ on the soluble guanylate cyclase activity in the presence of 10⁻³ mM AMP.

전반적으로 볼 때 긴세노시드 Rb₂나 AMP가 단독적으로 존재할 때는 입자상 효소나 가용성 효소에 대하여 억제효과를 나타내었으나 두 물질이 함께 존재할 때는 단독으로 존재할 때의 억제효과를 상당히 감소시켰다. 이러한 결과들은 입자상 효소계와 가용성 효소계의 작용이 긴세노시드 Rb₂와 AMP에 의해 조절될 수 있음을 의미한다. 이러한 결과에서 이들 효소계에는 AMP와 긴세노시드 Rb₂가 특이하게 결합하는 자리들이 있다는 것을 알 수 있다. 그러나 결합 자리들의 본질에 대해서는 아직 밝혀진 것이 없다.

3. NAD^+ , NADH 및 요오드가 입자상 guanylate cyclase 와 가용성 guanylate cyclase 에 주는 효과

NAD^+ 와 NADH 가 입자상 guanylate cyclase 의 활동도에 미치는 효과를 Fig. 8에 나타내었다. NAD^+ 는 10^{-3} mM 내지 1.0mM 의 농도 범위에서 이 효소계에 조금 밖에 영향을 주지 않으나 NADH는 같은 농도 범위에서 억제 효과를 나타내었다. 이 효소계는 산화제에 의해서 활성화되고 환원제에 의해 억제된다는 연구 결과가 많이 보고 되었으며 이 효소의 조절메카니즘의 하나가 산화 환원이라고 주장하는 사람도 있다⁵⁾. 또한 최근에 Ge-rezer 등¹⁶⁾은 소의 허파로부터 얻은 가용성 guanylate cyclase 에 험과 구리 이온이 존재함을 확인하였다. 아직 험과 구리 이온이 guanylate cyclase 의 활동성의 조절에 어떠한 역할을 하는지 밝혀지지 않았지만, cGMP의 형성에 영향을 주는 것으로 생각되고 있다. 그런데 본 실험 결과에서 산화제인 NAD^+ 가 이 효소를 조금 밖에 활성화시키지 못한 것은 이것의 산화력이 효소의 보결원자단을 산화시키기에는 부족하기 때문이며 NADH가 억제하는 것은 이것의 환원력이 이 효소를 충분히 환원시킬 수 있기 때문이라고 생각한다. 이 결과에서 세포내의 산화 환원반응에 중요한 물질인 NAD^+ -NADH가 guanylate cyclase 의 활동성 조절에 관여할 것으로 생각된다.

요오드가 입자상 guanylate cyclase와 가용성 guanylate cyclase에 미치는 효과는 Fig. 9에 표시하였다. 요오드는 이 두 효소계에 대하여 상이한 효과를 나타내었다. 입자상 효소는 10^{-2} mM의 요오드에 의해서 다소 활성화되다가 농도가 더 증가함에 따라서 억제되었

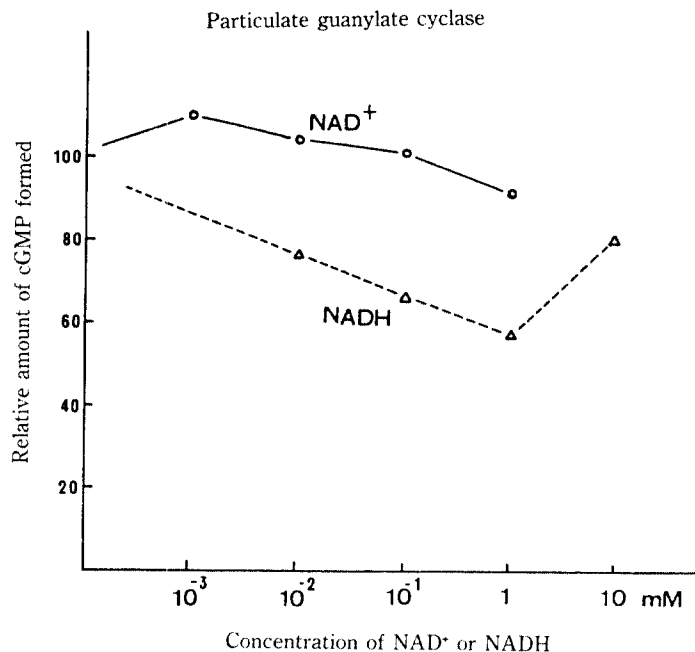


Fig. 8. Effects of NAD^+ and NADH on the particulate guanylate cyclase activity.

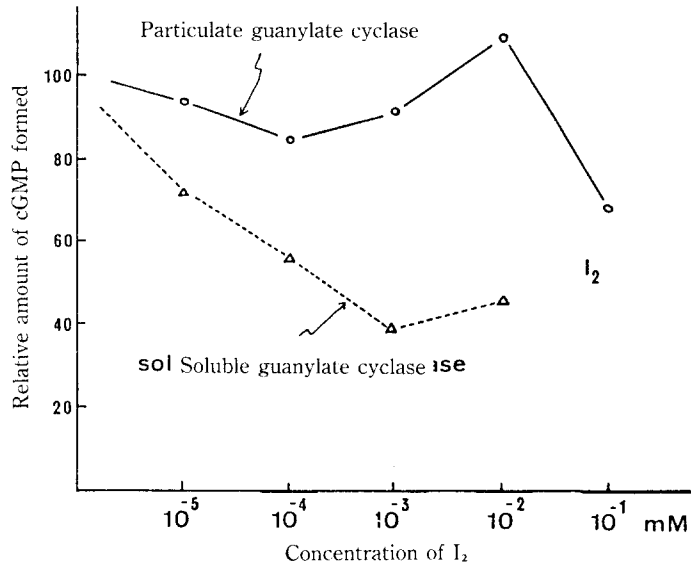


Fig. 9. Effects of I₂ on the particulate guanylate cyclase and soluble guanylate cyclase activity.

으며 가용성 효소는 10⁻⁵mM에서 10⁻²mM까지의 농도 범위에서 상당히 억제되었다. 이 두 효소계는 서로 성질이 다르다는 것을 이 결과에서도 짐작할 수 있다.

요 약

GMP를 비롯한 여러가지 뉴클레오티드들, 긴세노시드 Rb₂, 및 산화 환원제들이 쥐의 뇌에서 얻은 입자상 및 가용성 guanylate cyclase의 활동성에 미치는 영향을 조사하였다.

GMP, AMP, ADP, 및 ATP들은 낮은 농도에서는 입자상 guanylate cyclase의 활동성에 별로 영향을 미치지 않지만, 그들의 농도가 증가함에 따라서 이 효소들에 대한 억제 효과가 증가하였다. 마찬가지로, 가용성 guanylate cyclase의 활동성도 뉴클레오티드들의 농도가 증가함에 따라서 억제되었다.

GMP, AMP, ADP 및 ATP들의 입자상 guanylate cyclase와 가용성 guanylate cyclase의 활동성에 대한 억제 효과는 긴세노시드 Rb₂에 의해서 감소되었다. 이것은 guanylate cyclase 분자에 뉴클레오티드들과 긴세노시드 Rb₂에 대한 특이한 결합자리가 있다는 것을 암시하는 것으로 생각된다.

NAD⁺는 입자상 guanylate cyclase의 활동성에 거의 영향을 미치지 않지만, NADH는 이 효소계의 활동성을 억제한다. 입자상 guanylate cyclase는 요오드에 의해서 조금 억제되지만, 가용성 guanylate cyclase는 많이 억제되었다.

사 의

이 연구는 아산사회복지사업재단의 1984년도 연구비 지원과 1985년도 문교부 학술연구 조성비 지원에 의하여 이루어졌음.

인용 문헌

1. 서기림 · 고문주 · 이윤영 · 박인원 · 이세영 : 고려인삼학회지 **7**, 95 (1983, a).
2. 서기림 · 문종건 · 차미경 · 이광승 · 이세영 · 이윤영 · 박인원 : 고려인삼학회지 **7**, 148 (1983, b)
3. Goldberg, N. D., M. K. Haddox, E. Dunham, C. Lopez, and J. W. Hadden : *The Cold Spring Harbor Symposium on Regulation of Proliferation in Animal Cells*. Academic Press, Inc., New York, p. 609, (1974).
4. Rodbell, M. : *Nature* **284**, 17 (1980).
5. Goldberg, N. D., G. Graff, M. K. Haddox, J. H. Stephenson, D. B. Glass, and M. E. Moser : *Adv. in Cyclic Nucleotide Res.* **9**, 101 (1978).
6. Oura, H., S. Hiai, Y. Odaka, and T. Yokozawa : *J. Biochem.* **77**, 1057 (1975).
7. Nakazawa, K., M. Sano : *J. Biol. Chem.* **249**, 4207 (1974).
8. Chrisman, T. D., D. L. Garbers, M. A. Park, and J. G. Hardman : *J. Biol. Chem.* **250**, 374 (1975).
9. Lowry, O. H., N. H. Resebrough, A. L. Fair, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
10. Garbers, D. L. and F. Murad : *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **10**, 57 (1979).
11. Hardman, J. G. and E. W. Sutherland : *J. Biol. Chem.* **244**, 6363 (1969).
12. Kimura, H. and F. Murad : *J. Biol. Chem.* **249**, 6910 (1974).
13. Criss, W. E., F. Murad, H. Kimura, and H. : P. Morris *Biochim. Biophys. Acta.* **445**, 500 (1976a).
14. Criss, W. E., F. Murad, H. Kimura : *J. Cyclic Nucleotide Res.* **2**, 11 (1976b).
15. Bradham, L. S. and W. Y. Cheung : *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **27**, 189 (1982).
16. Gerezer, R., E. Böhme, F. Hofmann, and G. Schultz : *FEBS Lett.* **132**, 91 (1981).