

인삼에서의 Polyamine 합성에 관련된 효소와 Polyamine 함량에 관한 연구

조병구 · 조영동*

한국인삼연구초연구소

*연세대학교 이과대학 생화학과

(1989년 4월 15일 접수)

A Study of Polyamine Biosynthetic Enzymes and Content of Polyamine in Ginseng

Byung Goo Cho and Young Dong Cho*

Korea Ginseng Tobacco Research Institute, Daejon 302-345, and

*Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University Seoul 120-749, Korea

(Received April 15, 1989)

Abstract □ The polyamine and its biosynthetic enzyme in ginseng has been studied. We have found that putrescine was a major polyamine in ginseng seedling. Putrescine was increased with growth stage, and ADC activity was also increased as putrescine content. But ODC activity was not shown. ADC activity was shown 10% inhibition by spermidine and 20% inhibition by spermine but not affected by putrescine. In contrast to seed, spermidine was a major polyamine in two year old ginseng. The abundance was decreased in order of leaf, petiole, root, and stem. ADC activity seemed to parallel with polyamine content.

Keywords □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, polyamine, putrescine, spermidine, spermine, ornithine decarboxylase, arginine decarboxylase

서 론

1678년 Leeuwenhoek 에 의해 spermine phosphate 가 분리된 이래 동물은 물론 식물과 미생물 등 모든 생명체에서 polyamine 이 발견되고 연구되어 왔다. Polyamine 은 diamine 인 putrescine 과 cadaverine, triamine 인 spermidine, tetramine 인 spermine 등이 있으며, 그외에 여러 형태의 유도체가 있다.

Polyamine 의 기능은 생체막에 있는 음이온을 띤 phospholipid head 와 다른 anionic site 와 작용해서 생체막의 stability 와 침투성에 영향을 준다고 하며,¹⁾ 핵산에 작용해서 그 구조와 기능에 영향을

준다고 보고되어 있다.²⁾ 또한 여러 효소에 영향을 주며,³⁾ 거대분자의 합성을 조절하며,⁴⁾ stress 에 대해 생체를 보호해주는 역할을 한다.⁵⁾ 또한 polyamine 은 성장과 분화에 밀접한 관련이 있으며, 이와 관련된 효소들의 활성을 조절한다고 한다.⁶⁾

Polyamine 생합성의 주된 경로는 ornithine decarboxylase(ODC)에 의해서 ornithine 이 putrescine 으로 전환되는 경우와 arginine decarboxylase(ADC)에 의해 arginine 이 agmatine 으로 전환되어 이것이 putrescine 으로 형성되는 경우가 있다.⁷⁾ 그런데 식물에서는 위 두 효소가 환경과 성장시기 등 여러조건에 의해 그 활성도가 변한다고 보고되어 있다.⁸⁾ 또한 polyamine 합성의 조절효소

인 arginine decarboxylase가 그 end product 인 putrescine, spermidine, spermine에 의해 feed back inhibition 된다고 한다.⁹⁾

이러한 작용을 하는 polyamine은 아직 우리나라 고유의 식물인 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)에서 전혀 연구되어진 바 없어서, 인삼의 경우 polyamine의 함량과 그 합성경로, 또 생육시기에 따른 합성효소의 활성변화와 그 효소의 조절기작을 알고자, 인삼종자와 2년생 인삼을 가지고 다음과 같은 실험을 수행하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료와 생육조건

인삼은 종자와 1년생 인삼을 사용했으며, 종자를 24시간 물에 담근 뒤 15°C growth chamber에서 12시간씩 광과 암을 처리하여 키웠다. 1년생 인삼은 이식후 잎이 완전히 퍼진 1개월 후에 채취하여 실험에 사용했다.

2. Polyamine의 추출과 정량⁸⁾

채취한 인삼을 1gr씩 취하여 미리 차게한 5% (v/v) perchloric acid 4ml에 간뒤 1시간 동안 4°C에서 방치하여 12,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 그 상층을 200 μl 취하여 dansyl chloride (5mg/ml in acetone) 400 μl와 포화 Na₂CO₃ 200 μl와 함께 섞어서 12시간 암상태에서 방치한 뒤, proline(100mg/ml) 100 μl를 가하여 30분간 상온 방치하고, benzene 500 ml를 가하여 dansyl 유도체를 추출하였다. 이를 N₂ gas로 날리어 보내고 다시 benzene 100 μl를 가하여 녹이고, 일정량을 silica gel 60 plate에 점적하여 chloroforme : triethylamine(5 : 1)에 전개시켜 spectrofluorometer로 정량했다. 이때 excitation 파장은 350 nm 이고 emission 파장은 490 nm 이다.

3. ADC와 ODC 측정¹⁰⁾

채취한 인삼을 200 mM tris-HCl(pH 8.0), 10 mM dithiothreitol, 0.1 mM pyridoxal phosphate, 0.1 mM EDTA로 된 grinding medium에서 마쇄한 뒤 12,000×g에서 30분간 원심분리하여, 상층을 효소원으로 사용했다. 반응액의 조성은 80 mM tris-HCl(pH 8.0) 1.6 mM DTT, 0.04 mM pyridox-

al phosphate, 0.04 mM EDTA이며 L-ornithine과 L-arginine은 최종 4 mM 되게 하였다.

여기에 0.1 uCi(342 mCi/mmol) L-[U-¹⁴C] arginine과 0.1 uCi(59 mCi/mmol) L-[1-¹⁴C] ornithine을 각각 넣은 뒤 효소원을 넣어 반응을 시작했다. 반응시 나오는 CO₂는 methylbenzethonium hydroxide 20 μl를 잘게짜른 여과기에 묻힌 후 vial의 rubber stopper에 매달아서 흡착시켰다. 반응은 1시간 27°C에서 시켰으며, 2NH₂SO₄ 0.5 ml를 넣어 반응을 종료시켜, 30분 동안 shaking한 뒤 여과지만 scintillation vial에 넣고, Bray's solution을 cocktail로 하여 liquid scintillation counter(Beckman)로 방사능을 측정하였다.

4. 단백질 정량

Lowry 방법¹¹⁾에 의하여 단백질을 정량하였으며, 표준으로는 BSA를 이용했다.

5. 시 약

L-[U-¹⁴C] arginine, L-[1-¹⁴C] ornithine은 Amersham사에서 구입했으며, 기타 조효소 및 시약은 Sigma사와 일제 특급을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼종자의 polyamine 함량조사

인삼종자를 24시간 soak시킨 후 15°C growth chamber에서 발아시키면서 polyamine 함량을 조사하였다. 먼저 Fig.1은 인삼종자의 생장곡선을 그

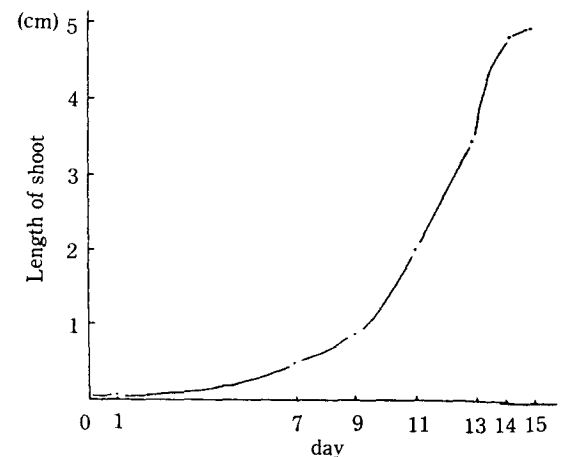


Fig. 1. Growth curve of ginseng seedling.

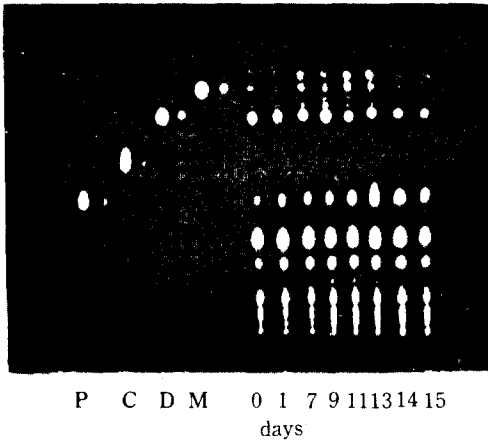


Fig. 2. Thin layer chromatogram of polyamines of ginseng seedling. P, putrescine; C, cadaverine; D, spermidine; M, spermine; the number represents day.

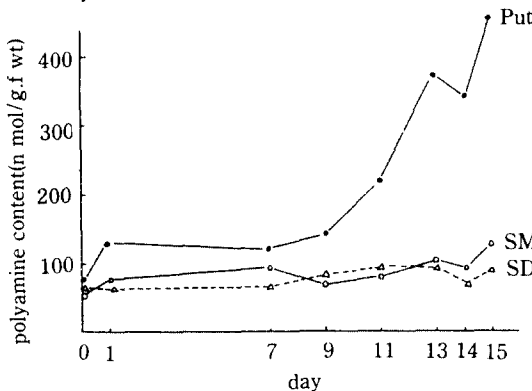


Fig. 3. Content of polyamine of ginseng seedling at various growth stage.

린 것이다. 전형적인 성장 pattern을 보여주고 있으나, *Glycine max* 등보다 아주 느리며 그 shoot의 길이도 짧다.

Fig.2는 polyamine의 TLC pattern인데, 그 분리가 양호하였다. Putrescine의 RF는 0.37, spermidine의 RF는 0.59, spermine의 RF는 0.74이었다. 그리고 cadaverine의 경우 인삼 seedling에서는 없는 것 같다.

Fig.3은 각각의 polyamine의 양을 생육 시기별로 조사한 것인데, 종자에서의 주된 polyamine은 putrescine임을 보여주며, 시기가 지날수록 급격히 putrescine 함량이 증가하고 있음을 알 수 있다. Spermidine과 spermine의 함량은 서로 비슷함을 보여주고 있으나 모든 시기에서 putrescine보다는

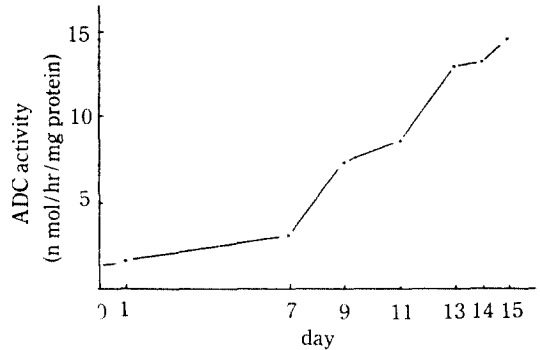


Fig. 4. Activity of arginine decarboxylase of ginseng seedling at various growth stage.

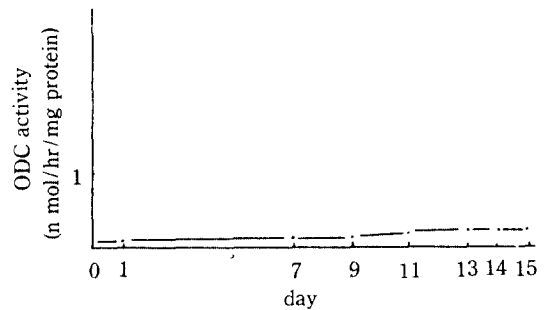


Fig. 5. Activity of ornithine decarboxylase of ginseng seedling at various growth stage.

낮으며, putrescine과는 달리 시기에 따른 별다른 변화는 보여주고 있지 않았다.

2. 인삼종자에서의 polyamine 합성효소 활성도 변화

Fig.4를 보면 시기가 지날수록 agmatine decarboxylase의 활성도는 점차 증가하고 있음을 알 수 있다. 이 경향은 Fig.3의 polyamine 함량변화에서 putrescine의 변화경향과 일치됨을 알 수 있다. 물론 agmatine iminohydrolase의 활성도를 관찰하여야만 좀더 정확한 설명이 될 것이지만, ADC가 조절효소이므로 거의 putrescine 함량변화에 절대적인 인자가 바로 ADC 활성도라고 설명할 수 있겠다. Fig.5는 ornithine decarboxylase 활성도를 조사한 것인데, 시기의 경과에 따른 아무런 활성변화를 보이지 않으며, 그 활성도도 거의 보이지 않고 있다. 그러나 4년생 인삼 앞에서는 ODC의 활성도를 보이고 있으며, 이 값은 ADC의 약 70%가 된다. 이는 인삼종자의 경우 성장에 필요한 polyamine은 ADC 단독으로도 그 함량을 충당할 수 있고, 고

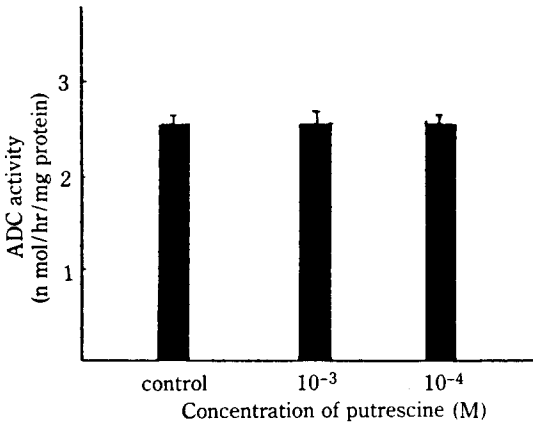


Fig. 6. Effect of concentration of putrescine on ADC activity of ginseng seedling.

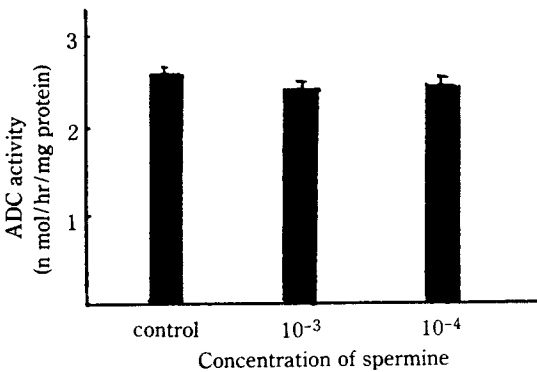


Fig. 7. Effect of concentration of spermidine on ADC activity of ginseng seedling.

년생으로 갈수록 ODC의 활성도 필요할 것이라고 생각된다.

3. ADC 활성에 미치는 각 polyamines의 영향

다음은 ADC 활성에 미치는 polyamines의 영향에 대해서 살펴보았다. Putrescine의 경우 (Fig.6) 10^{-3} , 10^{-4} M에서 아무런 영향이 관찰되지 않았다. Spermidine의 경우 (Fig.7) 10^{-3} M에서는 9%, 10^{-4} M에서는 7% 정도의 inhibition을 보이고 있으나, spermine의 경우에는 (Fig.8) 10^{-3} M에서는 24%, 10^{-4} M에서는 10% 정도의 inhibition을 나타내었다. 이 결과는 Murari⁸⁾의 결과와 유사하나 그 inhibition 정도에는 차이가 있다. 이는 본 실험에서는 crude enzyme를 사용했기 때문에 다른 cofactor의 영향도 많아서 큰 영향을 나타나지 않은 것 같다.

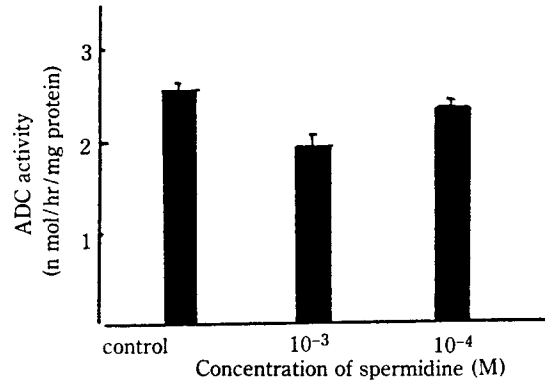


Fig. 8. Effect of concentration of spermine on ADC activity of ginseng seedling.

Table 1. Content of polyamine and ADC activity of various parts of two year old ginseng

	leaf	root	stem	petiole
Putrescine ^a	90.7	28.8	6.6	19.7
Spermidine ^a	356.7	71.9	62.4	286.1
Spermine ^a	114.3	49.1	29.3	70.8
ADC ^b	106.7	8.23	5.03	26.48
ADC ^c	3.44	2.23	1.09	2.55

Unit: a = nmol/g fwt; b = nmol/hr/g fwt; c = nmol/hr/mg protein.

Murari의 경우는 ADC를 순수분리하여 실험을 해서 확실한 feed back inhibition을 보여준 것 같다. 앞으로 인삼에서도 ADC를 순수분리하여 실험을 해야 확실한 결과가 나올 것 같다.

4. 2년생 인삼의 각 부위별 polyamine의 양과 ADC 활성도

2년생 인삼의 경우는 종자와는 달리 putrescine이 주된 polyamine이 아니라 spermidine이 주된 polyamine임이 관찰되었다 (Table 1). 그리고 spermine도 상당히 많이 존재하므로 해서 종자와는 다른 경향을 보이고 있다. 부위별로는 잎이 가장 많고, 그 다음으로 엽병, 뿌리 그리고 줄기 순이었다.

ADC의 경우 specific activity나 단위 조직당 활성도도 잎, 엽병, 뿌리 그리고 줄기 순이었다. ODC의 관여 여부는 실험은 안되어 있지만, polyamine의 양으로 보아 ODC도 관여할 것이라 추측된다.

2년생 인삼을 출아시키면서, ADC, ODC의 활성과 각 polyamine의 함량변화를 관찰하여야 인삼에서의 정확한 polyamine 합성과정이 밝혀질 것이다.

요 약

인삼에서의 polyamine의 함량과 그 합성효소에 대해서 관찰하였다. 종자의 경우 주된 polyamine은 putrescine이며, 성장하면서 putrescine이 증가되고 있다. ADC는 putrescine의 증가와 같은 경향으로 활성도가 증가되고 있다. ADC 활성도는 putrescine에 의해서는 별영향을 안 받았으나, spermidine은 10%내외, spermine은 20% 정도의 inhibition을 받았다.

주로 많았으며, spermine도 상당히 많았다. 오히려 putrescine이 상대적으로 적었다. 부위별로는 잎이 가장 많고 열병, 뿌리 그리고 줄기 순으로 분포한다. ADC의 활성도 polyamine 함량과 같은 경향을 보인다.

References

1. Johnson, W.T. and Nordlie, R.C.: *Life Sci.* **26**, 297 (1980).
2. Behe, M. and Felsenfeld, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1619 (1981).
3. Kuehn, G.D. and Atmar, V.J.: *Fed. Proc.* **41**, 3078 (1982).
4. Abraham, A.K. and Pihl, A.: *Trends Biochem. Sci.* **6**, 106 (1981).
5. Richards, F.J. and Coleman, R.G.: *Nature (London)* **170**, 460 (1952).
6. Cohen, S.S.: *Introduction to polyamines*. Prentice-Hall, New Jersey (1971).
7. Bachrach, U.: *Function of naturally occurring polyamines*, Academic Press.
8. Bagni, N., Barbieri, P., Torrigiani, P.: *J. Plant Growth Regul.* **2**, 177 (1983).
9. Murari, M.C. and Bharati, G.: *Agric. Biol. Chem.* **46**(3), 739 (1982).
10. Bicecka, H., Alan J. Bitonti and Peter P. Mc Cann: *Plant Physiol.* **79**, 509 (1951).
11. Farr, A.L., O.H. Lowry, R.J. Randall and Rosebrough, N.I.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).