

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) Agmatine Iminohydrolase의 정제 및 특성(I)

김효섭 · 김희정 · 조영동*

연세대학교 이과대학 생화학과, * 생물산업소재연구센터
(1995년 10월 25일 접수)

Purification and Characterization of Agmatine Iminohydrolase from *Panax ginseng* C.A. Meyer(I)

Hyo Sup Kim, Hee Jung Kim and Young Dong Cho¹

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

¹Bioproduct Research Center

(Received October 25, 1995)

Abstract Agmatine iminohydrolase (EC 3.5.3.12) catalyzes the hydrolysis of agmatine into putrescine. The enzyme seems to be one of the critical enzymes in putrescine biosynthesis. The enzyme was purified to homogeneity from *Panax ginseng* C.A. Meyer by combined method of ammonium sulfate fractionation, DEAE anion exchange column, hydroxyapatite column and agmatine carboxyhexyl Sepharose 4B affinity column. The molecular weight estimated by native pore gradient polyacrylamide gel electrophoresis was 71,000 dalton, while that estimated by SDS-PAGE was 70,000 dalton, indicating a monomeric enzyme. The optimal pH and temperature were 9.0 and 37°C, respectively. The K_m and V_{max} for agmatine were 8.3 mM and 14.4 nmole/hr, respectively. Heat stability of this enzyme was high. The enzyme was observed to be inhibited by polyamines such as putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. Especially, putrescine was a potent inhibitor of the purified enzyme. These results suggest that polyamines could be important in growth regulation of *Panax ginseng* C.A. Meyer.

Key words *Panax ginseng* C.A. Meyer, agmatine iminohydrolase, polyamines.

서 론

식물에서 polyamine의 합성 및 분해에 관한 연구는 동물이나 미생물에 비하여 그리 활발하지 않다.¹⁾ 더 구나 반음자 식물이며, 한국을 대표하는 영약으로 알려진 인삼에서는 저자들이 발표한 것 이외에는 거의 없는 실정이다.^{2~4)} 전보^{2~4)}에 따르면, 인삼에서도 다른 여러 식물에서와 마찬가지로 putrescine을 만드는데에는 두 경로가 존재하는 것으로 여겨진다. 경로는

arginine에서 ornithine을 거쳐 putrescine이 되는 과정과 arginine이 agmatine을 거쳐 putrescine으로 되는 두 과정에 의해 putrescine이 생성되고, 이 putrescine이 dcSAM이 작용하여, spermidine 및 spermine을 합성하는 것으로 보여 진다.⁵⁾

상기한 두 경로중 첫번째 경로에 관련된 효소인 arginase와 ornithine decarboxylase에 관하여 이미 보고한 바 있으며, 또한 두번째 경로에서 첫번째로 관여하는 arginine decarboxylase에 관해서도 저자들에 의해 보고된 바 있다.^{2~4)} 하지만 두번째 경로에서 두번째로 작용하는 agmatine iminohydrolase(EC 3.5.5.12)에 관해서는 다른 식물에서는 보고되어 있지만^{6~}

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : (02) 361-2697, Fax : (02) 313-1608.
E-mail. CYD516@Bubble.Yonsei.Ac.Kr.

⁹⁾ 인삼에서는 보고되지 않았기 때문에 이 효소에 관한 성질은 전혀 알려지지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인삼 뿌리에서 이 효소를 정제하여 여러 성질을 조사하여 생리적 생물학적 및 생화학적 연구를 수행하는 데 도움을 주고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

(1) 시약

Agmatine sulfate, activated carboxyhexyl Sepharose 4B, Tris-HCl, Coomasie Brilliant Blue R-250, acrylamide, N,N-methylene-bis-acrylamide, sodium dodesyl sulfate, TEMED, putrescine, spermidine, spermine, cadaverine, bovine serum albumin, D-arginine, L-arginine, D-lysine 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. Molecular weight marker와 hydroxyapatite는 Bio-Rad사의 제품을 사용하였고, DEAE-toyopearl은 Toyo사의 제품을 사용하였다.

그 밖의 실험에 이용된 모든 용매 및 시약들은 Waco, Junsei, Shinyo사 제품을 사용하였다.

(2) 실험 식물

본 실험에 사용한 인삼은 대전에 있는 한국인삼연초연구소에서 재배된 자격종 인삼이며, 학명은 *Panax ginseng* C. A. Meyer이다. 2년생 인삼 뿌리를 인삼연초연구소에서 받아 사용하였다. 인삼 뿌리를 캔 후, 흙을 털어내고 잘 세척한 다음, 중류수로 헹구고 물기를 빼어 곧바로 사용하거나, -70°C에 보관하였다가 사용하였다.

2. 효소의 활성 측정

인삼에서의 agmatine iminohydrolase의 활성 측정은 Krallmann-Wenzel. U¹⁰⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. Phenolnitroprusside용액은 phenol 5 g과 sodium nitroprusside 25 mg을 중류수에 녹여 500 ml로 만든 것이며 sodium hypochlorite 용액은 sodium hypochlorite 10 g을 0.5% NaOH를 포함한 중류수에 녹여 1 l로 만든 것이다. 반응 혼합물을 최종 농도가 50mM sodium pyrophosphate buffer(pH 8.0), 50 mM agmatine이 되게 효소액을 포함하여 250 μl가 되게한 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응은 0.2 M NaOH를 250 μl 넣어 중지시킨 후 acetone과 2 mM MgSO₄를 1:3으로 혼합한 용액 10 μl를 가하여 강

하게 vortexing하였다. 여기에 phenol nitroprusside 용액과 sodium hypochloride용액을 각각 250 μl씩 가하여 다시 강하게 vortexing한 뒤 37°C에서 15분간 방치하고 636 nm에서 흡광을 측정하였다. 생성된 ammonium ion의 양은 0.5 mM NH₄Cl을 이용하여 미리 작성한 표준곡선에 근거하여 계산하였다. 효소 1 unit은 1시간 동안 1 nmole의 ammonia를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정하였고, 비활성도(specific activity)는 단백질 1 mg당 효소 활성(unit)으로 나타냈다.

3. Agmatine-carboxyhexyl Sepharose 4B의 제조

이것을 제조하는데는 Pharmacia Fine Chemical의 방법을 따랐다. 먼저 activated-CH-Sepharose 4B를 1 mM ice-cold HCl에 swelling시켰다. Sintered glass filter를 사용하여 1 mM ice-cold HCl로 씻어주고, re-swelling시켰다. 한편, 0.1 M NaHCO₃(pH 8.0) 완충용액에 agmatine을 녹여두었다가 이 agmatine solution과 activated-CH-Sepharose 4B gel suspension을 end-over-end mixer를 사용하여 실온에서 15시간 동안 mixing하였다. 0.1 M NaHCO₃(pH 8.0) 완충용액으로 excess agmatine을 씻어냈다. 이렇게 만들어진 product를 0.1 M formate + 0.5 M NaCl 완충용액(pH 4.0)과 0.1 M Tris-HCl + 0.5 M NaCl(pH 8.0) 완충용액으로 씻어주었다.

4. 단백질 정량

본 실험의 모든 단백질은 Lowry방법¹¹⁾으로 정량하였고, bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하였으며, 표준곡선과 시료는 Kontron spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Agmatine iminohydrolase의 정제

-70°C에 보관하였던 2년생 인삼 뿌리 100 g을 냉장실에서 서서히 해빙시킨 후, 칼로 아주 얇게 썰었다. 여기에 5 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 6% glycerol이 포함된 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 200 ml을 가해 mixer로 과쇄하였다. 과쇄액을 네겹의 거이즈로 거른 다음, 13,000×g에서 40분간 원심분리하여 그 상층액을 효소원으로 사용하였다. 위의 모든 과정은 4°C에서 수행하였다. 준비한 효소원에 일차 (NH₄)₂SO₄처리는 30%까지 실시하였으며, 처리 후 1시간 동안 더 저어주어 완전히 포화시켰다. 그리고, 13,000×g로 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하고,

상층액만을 모았다. 이 상층액에 다시 최종 농도가 50%가 되도록 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 위와 동일하게 처리하여 포화시킨 뒤 원심분리하여 침전물을 모았다. 이 침전물을 5 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 6% glycerol이 포함된 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 소량에 녹였다. 효소 활성 측정에 ammonia가 이용되기 때문에 이 효소액을 동일한 완충용액으로 4°C에서 3시간씩 2회 투석하였다. 얻은 단백질 용액은 5 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 6% glycerol이 포함된 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.5)으로 미리 평형시킨 DEAE-toyopearl column(4×1.5 cm)에 주입하여 흡착시킨 후 0~0.7 M NaCl의 농도 구배(30 ml/hr)를 실시하여 용출 시켰다. 활성 분획을 모아서 5 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 6% glycerol이 포함된 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)에 충분히 투석 후 얻은 단백질 용액을 모아서 동일한 완충용액을 이용해서 미리 평형시킨 hydroxyapatite column(3×1.7 cm)에 주입하여 완전히 흡착시킨 다음 50~300 mM phosphate 농도 구배(15 ml/hr)로 단백질을 용출 시켰다. 활성분획을 모아서 위와 동일한 완충용액으로 미리 평형시킨 agmatine-CH-Sepharose 4B column(0.5×6 cm)에 주입 후 0~1 M sodium chloride를 포함한 동일 완충용액으로 농도 구배(10 ml/hr)를 실시하여 단백질을 용출시켰다. 이 분획들중에서 agmatine iminohydrolase의 활성을 갖는 부분만 모아 동일한 완충용액에 투석하여 이하 실험에서 사용하였다.

6. Agmatine iminohydrolase의 분자량 측정

정제된 효소를 Laemmli¹²⁾의 방법에 따라 5~20% native pore gradient polyacrylamide gel 전기영동을 수행하여 native 분자량을 결정하였다. 이 과정에서 gel이 5~20%의 직선 농도구배를 갖도록 만들었다. Stacking gel은 4% acrylamide gel을 사용하였다. 전기영동 후 염색과 탈색과정을 거쳐 gel상에 나타나는 단백질 따로 ginseng roots agmatine iminohydrolase의 순도 및 native 상태의 분자량을 측정하였다. Subunit의 분자량 측정은 물중탕에서 가열하여 완전히 변성시킨 시료와 표준단백질을 Laemmli의 방법에 의해 전기영동을 수행하였다. 이때 stacking gel은 4%, running gel은 12.5%의 acrylamide를 포함시켰다. 전기 영동을 시행한 후, 염색과 탈색과정을 거쳐 단백질 따로 subunit을 확인하고, 표준 단백질과 이동

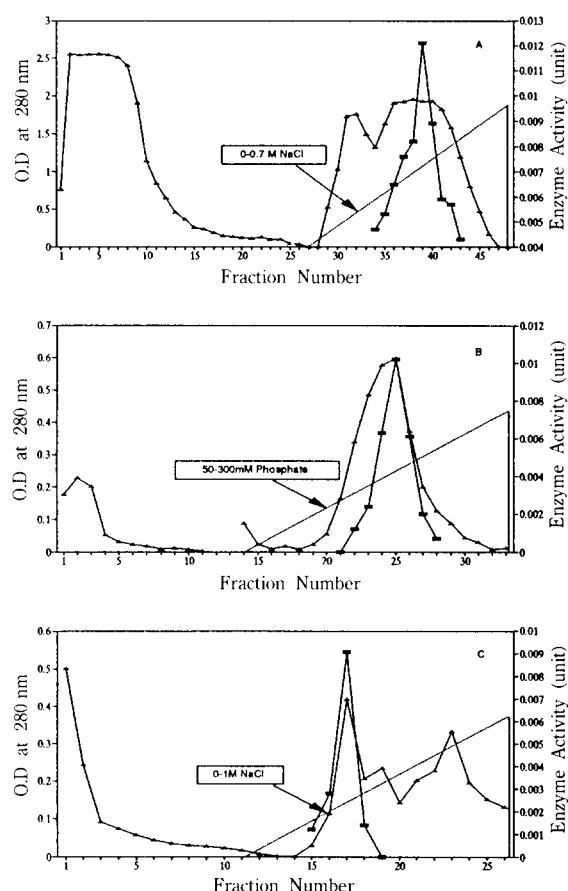


Fig. 1. The profiles of protein and ginseng roots agmatine iminohydrolase activity eluted from various chromatographies. ■: optical density; ▲: enzyme activity. A : DEAE-toyopearl ion-exchange chromatography, B : Hydroxyapatite column chromatography, C : Agmatine-CH-Sepharose 4B affinity column chromatography.

거리를 비교하여 subunit의 분자량을 결정하였다.

7. 기타

기질 특이성, K_m , V_{max} 값의 측정, 최적 온도 및 pH, polyamine이 효소의 활성에 미치는 영향 등을 Kang과 Cho¹³⁾의 방법을 따랐다.

결과 및 고찰

1. Agmatine iminohydrolase의 정제

효소원을 황산 암모늄 분별침전, DEAE-toyopearl ion exchange column chromatography, hydroxy-

Table 1. Purification of ginseng root agmatine iminohydrolase

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	1102.8	746.5	0.68	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30~50%)	187.04	475.1	2.5	63.6	3.8
DEAE-Toyopearl	23.15	201.1	8.7	26.9	12.8
Hydroxy Apatite	0.705	80.4	114.1	10.8	168.5
Agmatine-CH sepharose	0.054	25.1	465.4	3.37	687.4

*A unit of activity is defined as the amount of enzyme catalyzing the production of 1 nmole ammonia from agmatine per hour.

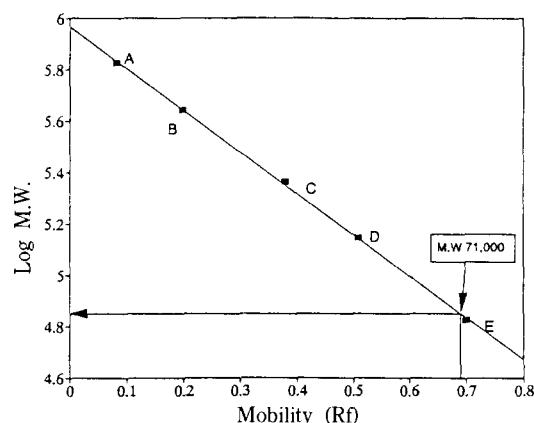


Fig. 2. Determination of native molecular weight of ginseng root agmatine iminohydrolase by native pore gradient gel electrophoresis. A : Thyroglobulin (669 kDa), B : Ferritin (440 kDa), C : Catalase (232 kDa), D : Lactate dehydrogenase (140 kDa), E : Bovine serum albumin (6.7 kDa).

patite column chromatography, agmatine-CH-Sepharose 4B column chromatography에 의해 Fig. 1(C)와 같은 효소 활성과 일치하는 단백질 peak를 확인하였으며, 이것을 polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 단일 단백질띠임을 확인하였다. 이때의 비활성도는 Table 1에서와 같이 465.4 nmole/hr/mg이었으며, 회수율은 3.4%이고, 정제도는 약 687배였다.

2. 분자량 측정

정제된 효소액을 native pore gradient gel electrophoresis로 native 분자량을 측정한 결과 71,000 dalton으로 나타났고(Fig. 2), subunit의 분자량은 SDS-PAGE상에서 70,000 dalton의 단일 띠를 나타내는 것으로 보아 이 효소는 monomer임을 알 수 있었다(Fig. 3). Corn⁹ 경우 agmatine iminohydrolase의 분자량이 85,000 dalton인 dimer¹⁰며, rice seedlings⁷에서는

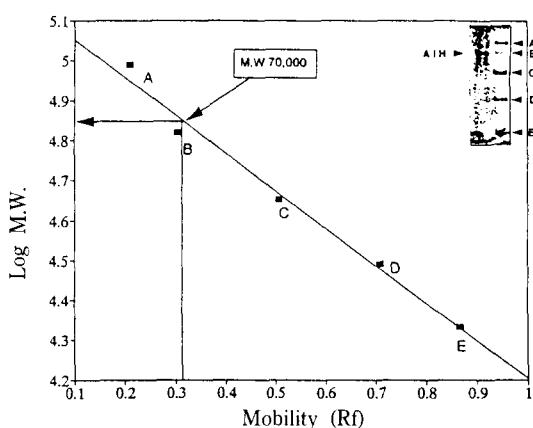


Fig. 3. Determination of molecular weight of ginseng root agmatine iminohydrolase by SDS-PAGE. A : phosphorylase b (97 kDa), B : bovine serum albumin (66 kDa), C : ovalbumin (45 kDa), D : carbonic anhydrase (31 kDa), E : trypsin inhibitor (21 kDa), F : lactoalbumin (14 kDa). Lane 1 represents the purified ginseng root agmatine iminohydrolase. Lane 2 represents marker protein.

분자량이 183,000 dalton인 dimer라는 보고가되어 있다. 본 연구진은 최초로 분자량이 70,000 dalton이고 monomer인 agmatine iminohydrolase가 대두 하배축에 존재함을 밝힌 바 있다.⁸⁾

반음지 식물인 인삼에서도 monomeric인 본 효소를 두번재로 찾은 것은 매우 의의가 있는 것으로 본다.

3. K_m 및 V_{max} 측정

Agmatine iminohydrolase의 기질인 agmatine의 농도를 변화시켜가면서 효소의 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot에 의해 분석한 결과, agmatine sulfate에 대한 K_m 값은 8.3 mM, V_{max} 값은 14.4 nmole/hr¹⁰었다(Fig. 4). 이 K_m 값은 대두 하배축의 2.5

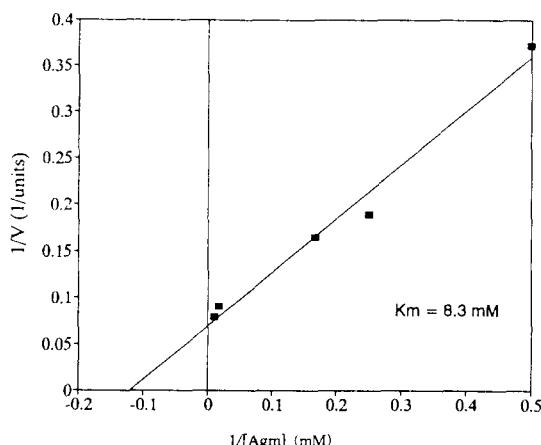


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of initial velocities measured at various concentrations of agmatine. The purified ginseng root agmatine iminohydrolase enzyme was used.

mM^8 , ground nut의 0.76 mM^6 , corn의 0.19 mM^9 및 rice seedlings의 15 mM^7 과 비교하여 볼 때 높은 편에 속한다. 그러므로, 인삼에서 정제한 agmatine iminohydrolase는 다른 식물에서 정제한 agmatine iminohydrolase에 비해 기질과의 친화력이 낮다고 할 수 있다. 인삼 agmatine iminohydrolase의 K_m 값이 큰 것은 putrescine의 생합성과 밀접한 관계가 있으며, 생물학적 및 생리학적 측면의 연구가 더 필요하리라 생각한다.

4. 효소 활성의 최적 pH 및 온도

효소의 최적 pH를 알아보기 위해 pH 4.0~5.5 구간에서는 0.1 M sodium citrate, pH 5.5~8.0 구간에서는 0.1 M phosphate, pH 7.5~9.0 구간에서는 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5~10.0 구간에서는 0.1 M glycine 완충용액을 이용하여 pH변화에 따른 효소 활성을 측정한 결과, 이 효소는 pH 9.0에서 최대 활성을 보였다. 이 값은 다른 식물로부터 분리 정제한 agmatine iminohydrolase의 최적 pH가 5.5~6.5라는 보고^{6~9)}에 비해 훨씬 높은 값이었다. 또한, 반응액의 온도 변화에 따른 agmatine iminohydrolase의 효소 활성을 27~80°C의 온도 구간에서 측정한 결과 37°C에서 최대의 활성을 보였다. 이것은 대두 하배축⁸⁾에서 정제한 agmatine iminohydrolase에 비해 낮은 값이었다.

5. Agmatine iminohydrolase의 열에 대한 안정성

열에 대한 안정성 조사는 27°C, 37°C, 50°C, 65°C,

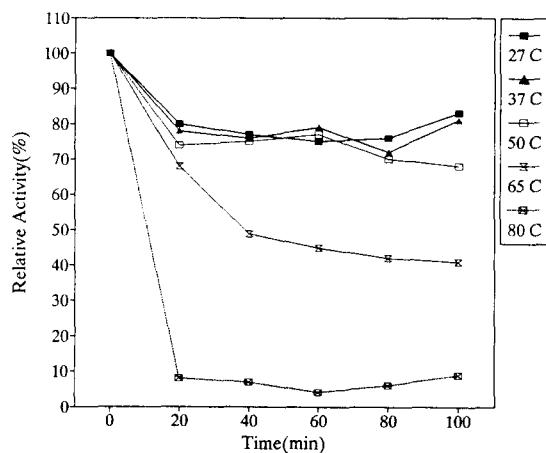


Fig. 5. Heat stability of ginseng root agmatine iminohydrolase. The purified ginseng root agmatine iminohydrolase was used.

Table 2. Substrate specificity of ginseng root agmatine iminohydrolase

Substrate	Relative activity (%)
Agmatine	100
D-Arginine	0
L-Arginine	0
Creatine	0
Citrullin	0
Lysine	0

80°C의 조건에서 각각의 효소를 방치해 두었다가 20분 간격으로 꺼내서 효소 활성의 변화를 측정한 것으로 27°C, 37°C, 50°C에서는 1시간 이상 방치해 두어도 70%까지 활성이 유지되었으나, 65°C, 80°C에서는 50% 이상 활성이 감소하였다(Fig. 5). 다른 식물로부터 정제한 agmatine iminohydrolase의 열에 대한 안정도 측정은 보고된 바가 없고, 인삼에서 정제한 arginase¹⁴⁾의 경우는 열에 상당히 안정하였다.

6. 기질 특이성

대두 하배축⁸⁾ 및 옥수수⁹⁾의 agmatine iminohydrolase에서는 agmatine에만 작용하고, arginine, creatine, citrulline, lysine에 대해서는 전혀 작용하지 않았다. 동일한 방법으로 조사한 결과, 인삼에서도 agmatine만이 효소 활성을 나타냈다(Table 2). Cho와 Cho^{2,3)}는 인삼에서의 arginine decarboxylase의 존재를 보고한 바 있는 데, 본 연구에서 arginine decarbo-

Table. 3. Effect of polyamines on ginseng root agmatine iminohydrolase activity

Polyamines	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	0	100
Putrescine	0.1	43
	0.5	40
	1	32
	5	23
	0.1	69
	0.5	61
Cadaverine	1	59
	5	43
	0.1	53
	0.5	42
	1	33
Spermine	5	29
	0.1	83
	0.5	66
	1	64
	5	40

Each data was the mean of three determinants.

xylase의 생성물인 agmatine에 작용하는 agmatine iminohydrolase의 성질 규명은 큰 의미가 있다고 본다. 즉 인삼에서도 arginine으로부터 ornithine을 거쳐서 putrescine을 형성하는 과정과 agmatine을 거쳐서 생성하는 두 과정이 존재함을 증명한 것이 되기 때문이다.

7. Polyamine에 의한 agmatine iminohydrolase의 활성 변화

Putrescine, spermidine, spermine, cadaverine을 농도별로 효소 반응액에 첨가하여 효소활성을 측정한 결과, putrescine, spermine, cadaverine, spermidine의 순으로 억제하는 것을 볼 수 있었다(Table 3). 대두 하배축⁸⁾과 corn⁹⁾에서는 이 효소가 polyamine에 의해 억제되지 않으며, ground nut⁶⁾에서도 10 mM spermine에 의한 억제가 보고되었다. 이에 비해 인삼에서 정제한 agmatine iminohydrolase는 putrescine, spermidine, spermine, cadaverine 각각에 대하여 모두 억제가 일어났으며, 그 중에서도 putrescine에 의한 억제가 가장 강하게 일어났다. Table 3에서 보여준 바 같이 인삼의 agmatine iminohydrolase는 groundnut의 경우보다 훨씬 낮은 농도에서 효소 활성을 억제 할 수 있는 것은 polyamine 합성 조절에 큰 의미가 있다고 사료된다.

상기한 결과는 이미 본 연구진이 polyamine 조절 기작에 관한 보고^{15) 17)}와 더불어 생체내에서 polyamine 대사를 이해하는데 기여할 것으로 본다.

감사의 말씀

본 연구는 94년도 산학 협동 재단의 지원에 의해 수행된 결과의 일부를 게재하는 것이며, 이에 감사드립니다.

요약

고려 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)으로부터 agmatine iminohydrolase를 황산암모늄 분별침전, DEAE-toyopearl ion exchange column chromatography, hydroxyapatite column chromatography, agmatine-CH-Sepharose 4B column chromatography에 의해 정제하였다. 정제된 효소의 비활성도는 465.4 nmole/hr/mg이며, 회수율은 3.4%이고, 정제도는 약 687배였다. 정제된 효소는 polyacrylamide gel electrophoresis에서 native 분자량이 71,000 dalton이고, subunit의 분자량은 70,000 dalton인 단일 띠의 monomer임을 알 수 있었다. 정제된 효소는 agmatine에 대해서만 기질 특이성을 가지고 있었으며, agmatine에 대한 K_m 값은 8.3 mM, V_{max} 값은 14.4 nmole/hr이었다. 최적 pH는 9.0이었으며, 최적 온도는 37°C이었다. 열에 대한 안정성은 27°C, 37°C, 50°C에서는 1시간 이상 방치해 두어도 70%까지 활성이 유지되었으나, 65°C, 80°C에서는 50%이상 활성이 감소하였다. Polyamine에 의한 효소활성 변화에서는 putrescine, spermine, cadaverine, spermidine의 순으로 억제하는 것을 볼 수 있었다.

인용 문헌

1. Tabor, C. W. and Tabor, H. : *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749 (1984).
2. Cho, B. G. and Cho, Y. D. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**, 19 (1989).
3. Cho, B. G. and Cho, Y. D. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**, 229 (1989).
4. Cho, B. G. and Cho, Y. D. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**, 6 (1990).

5. Song, J. H. and Cho, Y. D. : unpublished data.
6. Sindhu, P. K. and Desai, H. V. : *Phytochemistry*, **8**, 2111 (1979).
7. Chaudhuri, M. M. and Ghosh, B. : *Phytochemistry*, **24**, 2433 (1985).
8. Park, K. H. and Cho, Y. D. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**, 32 (1991).
9. Hiroshi, Y. and Suzuki, Y. : *Plant Physiol.*, **67**, 697 (1981).
10. Krallmann-Wenzel, U. : *Annu. Rev. Respiration Disease* **131**, 432 (1985).
11. Lowry, O. H., Rosebrough, J. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
12. Laemmli, U. K. : *Nature* **227**, 680 (1970).
13. Kang, J. H. and Cho, Y. D. : *Plant Physiol.*, **93**, 1230 (1990).
14. Kim, E. H. and Cho, Y. D. : unpublished data.
15. Yang, Y. G and Cho, Y. D. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 1181 (1991).
16. Kim, D. G. and Cho, Y. D. : *J. Biochem. Mol. Biol.*, **28**, 100 (1995).
17. Choi, Y. S. and Cho, Y. D. : *Biochim. Biophys. Acta* **1201**, 466 (1994).