

## 근 소포체 Ryanodine Receptor-Ca<sup>2+</sup> Release Channel Complex Protein에 미치는 인삼 성분의 영향

이희봉 · 한병돈<sup>1</sup> · 권상옥<sup>2</sup>

강원대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>1</sup>한일약품 중앙연구소, <sup>2</sup>연세대학교 원주의과대학 내과학교실  
(1996년 11월 12일 접수)

### Effect of Ginseng Components on Ryanodine Receptor-Ca<sup>2+</sup> Release Channel Complex Protein in Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle

Hee-Bong Lee, Byoung-Don Han<sup>1</sup> and Sang-Ok Kwon<sup>2</sup>

Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>1</sup>Hanil Pharmaceutical IND. Co., LTD, Central Research Institute, Seoul 656-408, Korea

<sup>2</sup>Yonsei University, Wonju College of Medicine, Department of Internal Medicine, Wonju 220-701, Korea

(Received November 12, 1996)

**Abstract :** In this study, the effects of red ginseng components [ginsenosides (total saponins and Rg<sub>1</sub>)] on the function of ryanodine receptor (RyR)-Ca<sup>2+</sup> release channel complex protein (named as RyR or Ca<sup>2+</sup> channel), a membrane protein in sarcoplasmic reticulum (SR) of rabbit skeletal muscle were examined at the SR vesicle's level and the molecular levels with Chaps-solubilized and purified Ca<sup>2+</sup> channel protein and with reconstituted proteoliposomes by dialysis. The results were as follows. 1. The binding of ryanodine known as inhibitor of muscle contraction to the RyR was decreased at the whole range of concentration (10<sup>-2</sup>~10<sup>-7</sup>%) by these two ginseng components. In heavy SR vesicles, Chaps-solubilized and purified Ca<sup>2+</sup> channel protein, and reconstituted vesicles, its maximal inhibition by total saponins was shown at the concentration of 10<sup>-3</sup>%, 10<sup>-4</sup>%, and 10<sup>-5</sup>% respectively, and by ginsenoside Rg<sub>1</sub>, each was 10<sup>-4</sup>%, 10<sup>-5</sup>%, and 10<sup>-6</sup>%. 2. The release of Ca<sup>2+</sup> ion through Ca<sup>2+</sup> channel in heavy SR vesicles and reconstituted proteoliposomes was increased as a whole by these two ginseng components, and particularly maximal release by both of them was shown at the range of 10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup>%. These results were seemed to be caused by conformational change of Ca<sup>2+</sup> release channel protein (RyR) by red ginseng components [ginsenosides (total saponins and Rg<sub>1</sub>)].

**Key words :** *Sarcoplasmic reticulum*, ryanodine receptor (RyR)-Ca<sup>2+</sup> release channel complex protein, red ginseng, proteoliposome.

## 1. 서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)에 관한 과학적 연구가 시작된 이래 유효성분 중 하나로 주목되고 있는 saponin류의 역할을 정리해 보면, 단백질 합성을 촉진시키는 호르몬과 같은 역할<sup>1)</sup>, 적절한 농도하에서 여러 가지 효소의 활성을 구조적 변형을 통하여

촉진시킨다는 계면활성제와 같은 역할<sup>2)</sup> 그리고 생체의 저항성을 촉진시키는 비특이적 적응 효과를 나타내는 adaptogen으로서의 역할<sup>3)</sup> 등이 보고되고 있다.

이들 보고된 인삼의 약리 효능들 중에서 운동과 관련된 효능을 구체적으로 살펴보면, 중추신경계에 대한 작용으로서 비특이적으로 완만한 흥분작용<sup>4)</sup>을 나타냄이 보고되었으며, 이러한 흥분작용은 인삼 엑기

스, 인삼근 또는 인삼 총 조사포닌으로도 나타남이 보고되었다. Takagi 등<sup>4)</sup>은 diol계 사포닌(Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>)은 진정작용을 나타내며, triol계 사포닌(Rg<sub>1</sub>)은 흥분작용이 있다고 하였으며, 홍 등<sup>5)</sup>은 인삼 사포닌의 생리적 용량에서 흰쥐의 자발운동, 일반운동(세우기, 걷기, 먹기 등) 및 야외 탐색량과 이동성등 활동력을 증가시킨다고 보고하였다. 또한 인삼의 항 피로작용으로 완전히 피로할 때까지 반복하여 수영시켰을 때 인삼 수침액기스 투여군에서 수영시간이 연장되었음<sup>6)</sup>이 보고되었으며, triol계 사포닌(Re, Rg<sub>1</sub>)이 비교적 강력한 항 피로작용이 있음<sup>7)</sup>이 보고되었다. 이들 결과들과 더불어 신경과 밀접하게 연관된 생리작용 중 위장관<sup>12)</sup>, 혈관<sup>13)</sup>, 자궁<sup>14)</sup> 등 여러 가지 평활근에 대한 항진작용도 보고되었다. 이러한 근육운동은 근육 세포내 sarcoplasmic reticulum(SR)을 통하여  $Ca^{2+}$ 을 release하거나 release된  $Ca^{2+}$  이온을 다시 uptake하여 근육수축과 이완을 조절<sup>15)</sup>함으로써 일어나게 된다. 골격근에서  $Ca^{2+}$  이온의 uptake는 SR  $Ca^{2+}$  pump 혹은( $Ca^{2+}+Mg^{2+}$ ) ATPase에 의해 영향을 받으며 이의 구조와 기능은 널리 알려져있다.<sup>16,17)</sup> 반대로, SR로부터의  $Ca^{2+}$  이온의 release는 neuromuscular synapse에서의 action potential에 의해 시발되어 signal 이 T-tubule에 도달되면, T-tubule과 SR membrane이 접촉하는 부위에서 signal transduction에 의하여 대량의  $Ca^{2+}$  이온이 빠르게 SR로부터 release 되는데<sup>18,19)</sup> 이때 관여하는 protein이  $Ca^{2+}$  channel이며, cDNA를 이용한 1차 구조(5037개 아미노산) 및 막에서의 예상구조<sup>20)</sup>가 알려져 있고, homotetramer로 매우 큰 단백질(분자량 약 2000 Kda)이며, 30S의 침강상수<sup>21)</sup>를 나타낸다. 또한 식물의 중성 alkaloid인 ryanodine이 높은 specificity와 affinity<sup>21)</sup> ( $K_d$ : 4~200 nM)를 가지고 결합하기 때문에 일반적으로 ryanodine receptor (RyR)- $Ca^{2+}$  release channel complex protein(RyR 또는  $Ca^{2+}$  channel)이라고 부른다. 또한 vesicle ion flux<sup>22)</sup>와 single channel measurement<sup>23)</sup>의 결과에 따르면 ryanodine의 nM농도에서  $Ca^{2+}$  channel이 open되며  $\mu$ M 이상 농도에서는 close 된다고 보고되었다.

본 연구에서는 위와 같이 각종 근육운동에 영향이 있는 것으로 알려진 인삼성분들 중에서 총 사포닌과 ginsenoside Rg<sub>1</sub>이 근육 수축운동에 직접 관여하는  $Ca^{2+}$  channel protein에 어떤 영향이 있는가를 소포

체 수준과 기능적 재조합을 이용한 분자 수준에서 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 시료

실험에 사용된 토끼는 일반사료로 사육하였고, diisopropyl fluorophosphate(DIFP), leupeptin, dithiothreitol(DTT), iodoacetamide, ethylene-glycoltetraacetate(EGTA), aprotinin, pepstatin, Phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF), 5-adenosine monophosphate(AMP)는 Sigma 제품을 사용하였고, <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>과 [<sup>3</sup>H]ryanodine은 각각 ICN사와 NEN사의 제품을 사용하였으며, Chaps와 ryanodine은 Calbiochem사, 95% phosphatidylcholine(PC) (from soybean)은 Avanti Polar Lipids사 제품을 사용하였으며, 다른 시약들은 분석용 시약급을 사용하였다. 또한, 인삼 성분은 한국 인삼연초연구원에서 공급받은 고려홍삼에서 추출한 ginsenoside 혼합물과 정제된 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 분획이었다.

### 2. 근 소포체의 제조

Rabbit skeletal muscle로부터 ryanodine binding과  $Ca^{2+}$  release activity가 높은 heavy SR vesicle을 각종 protease inhibitors(0.2 mM PMSF, 100 nM aprotinin, 1  $\mu$ M pepstatin, 1  $\mu$ M leupeptin, 1 mM iodoacetamide, 1 mM benzamidin) 하에서 Meissner 방법<sup>24)</sup>에 따라 differential과 sucrose gradient centrifugation 방법에 의해 분리하였다.

### 3. Heavy SR Vesicles의 용해와 $Ca^{2+}$ Release Channel Protein Complex(RyR)의 순수 분리

Heavy SR vesicle(1~2 mg/ml)로부터 30S  $Ca^{2+}$  channel의 순수분리는 변형된 Lai 등의 방법<sup>25)</sup>을 사용하였다.

5 mg/ml phospholipid(95% PC)와 zwitterionic detergent인 Chaps를 함유한 1 M NaCl, 100  $\mu$ M EGTA, 200  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ , 5 mM DTT, 1 mM DIFP, 1 mM Leupeptin, 20 mM NaPipes, (pH 7.4) 완충용액에 용해(1시간 상온에서, 1시간 얼음속에서 방치)시킨 후 원심분리(Beckman Ti80, 30,000 rpm, 30 min)하여 비용해성 물질을 제거하고  $Ca^{2+}$  channel protein을 함유하는 상층액을 10~20% sucrose gradient centrifugation(Beckman SW28, 26,000 rpm,

16 h)을 이용하여 분리하고 일정량씩 분획 채취한 후 [ $^3\text{H}$ ]-ryanodine이 처리된 control과 비교하여 한번에 순수 분리하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. sucrose gradient의 전체 조성은 같은 양의 두층으로 되어 있으며, 위층은 1 M NaCl, 100  $\mu\text{M}$  EGTA, 200  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 5 mM DTT, 0.5 mM DIFP, 0.5 mM Leupeptin과 1% detergent와 5 mg/ml의 phospholipid 그리고 5% sucrose가 함유된 20 mM NaPiPes pH 7.4이며, 아래층은 1/2 농도의 같은 detergent를 함유한 10~20% sucrose gradient 완충용액(위층과 같은 조성)을 사용하였다.

#### 4. $\text{Ca}^{2+}$ Release Channel Complex Protein의 Reconstitution

Ryanodine receptor(RyR)- $\text{Ca}^{2+}$  release channel complex protein의 lipid bilayer vesicles (95% PC로 만들어진 vesicles)로 이 등<sup>26)</sup>의 방법에 따라 reconstitution시켰다.

위에서 순수 분리된  $\text{Ca}^{2+}$  release channel을 함유한 용액을 dialysis bag(Mol. cut off 10,000)에 넣은 후 4°C 완충용액(0.5 M NaCl, 100  $\mu\text{M}$  EGTA, 200  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 0.5 mM DTT, 0.5 mM DIFP, 10 mM NaPiPes, pH 7.4) 하에서 2일 동안 투석하였다. 완충용액은 처음 2시간 후 그리고 매 8시간마다 신선한 용액으로 바꾸고, 투석이 끝난 후 투석액은 다른 완충용액(100  $\mu\text{M}$  EGTA, 200  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 0.5 mM DTT, 0.5 mM DIFP, 10 mM NaPiPes, pH 7.4)으로 2배 희석한 후 원심분리(Beckman Ti80, 50,000 rpm, 2 h) 하여 적절하게 농축한 다음 빠르게 얼렸다 서서히 녹이는 방법을 2번 수행한 후, 사용 전에 짧게 sonication 하여 재조합 vesicle을 제조하였다.

#### 5. 인삼성분의 영향 조사

Heavy SR vesicles, 순수 분리된 Chaps-solubilized RyR 그리고 재조합된 RyR에 미치는 홍삼 성분의 영향을 조사하기 위하여 홍삼 성분들 [ginsenosides(total saponins, Rg<sub>1</sub>)]을 여러 가지 농도(10<sup>-3</sup>%, 10<sup>-4</sup>%, 10<sup>-5</sup>%, 10<sup>-6</sup>%, 10<sup>-7</sup>%)로 넣고  $\text{Ca}^{2+}$  release 정도와 [ $^3\text{H}$ ] ryanodine binding을 조사하였다.

#### 6. Ryanodine Binding Assay

각 sample(약 10  $\mu\text{g}$  protein/ml)에 5 mM AMP와 50 nM, 400  $\mu\text{M}$  각각의 ryanodine {[ $^3\text{H}$ ] ryanodine+ryanodine}을 가한 후 22°C에서 8시간

방치 후 일부는 total counting 측정에 사용하였고, 나머지는 20배 ice-cold water로 dilution한 후 5% polyethyleneimine(vesicle 경우에는 1% PEI용액)에 잠겨진 Whatman GF/B filter에 붓고 5 ml ice-cold water로 세번 세척한 후 filter에 남아있는 방사능을 liquid scintillation counting 하여 bound [ $^3\text{H}$ ] ryanodine 양을 측정하였다.

#### 7. $\text{Ca}^{2+}$ Efflux 측정

Vesicles로부터의  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux는 Millipore filtration 방법<sup>27)</sup>에 의하여 측정하였다. 재조합 vesicles은 22°C에서 0.25 M NaCl, 100  $\mu\text{M}$  EGTA, 500  $\mu\text{M}$   $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , 10 mM NaPiPes, pH 7.4를 함유한 medium에서 방치하였고, ryanodine에 의한  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux의 영향을 관찰하기 위하여는 ryanodine(각각 100 nM, 200  $\mu\text{M}$ )을  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  첨가 후 30분 지난 다음 넣어 주었고, 계속 1시간 30분을 더 방치하였다. 전체적으로  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  첨가한 다음 2시간 후 각각 reconstituted vesicles의  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux는 등장액의 quench(10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 50  $\mu\text{M}$  Ruthenium red, 2 mM EGTA) media나 혹은 release(1.0 mM EGTA, 1.05 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) media를 25초와 70초 후에 100배 첨가하여 무게한 후 결정하였다.

전체 가능한  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  trap은  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore인 A 23187의 낮은 농도(200 pmol/ml)에서 2시간 방치 후 결정하였으며, trap되지 않은  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 이나 방출되는  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 은 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore filter(type GS)에 여과하여 제거되며 quench medium으로 세척 후 여과지 위 vesicle에 남아있는  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 의 방사능 양으로부터 측정하였다.

#### 8. SDS Polyacrylamide Gel 전기이동

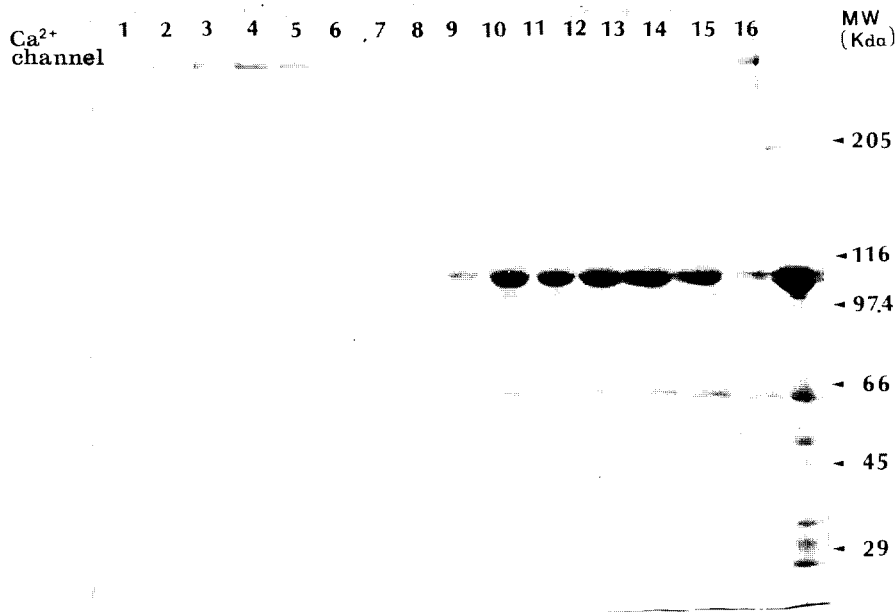
SDS-PAGE는 5~12% linear polyacrylamide gels과 3% stacking gels을 사용하는 Laemmli buffer system<sup>28)</sup>을 기본으로 이용하였고, coomassie 혹은 silver staining하여 band를 확인하였다.

#### 9. 그 밖의 Biochemical Assay

단백질 농도는 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filters(type HA)와 Amido black을 사용하는 Kaplan 방법<sup>29)</sup>이나 Folin-Lowry 방법을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 분리된 Heavy SR Vesicle내의 $\text{Ca}^{2+}$ Release



**Fig. 1.** SDS-PAGE analysis of each gradient fractions after sucrose gradient centrifugation of Chaps-solubilized heavy SR vesicles. Electrophoresis was done by the method of Laemmli on a 5~12% separating gel and 3% stacking gel. Lane 1~15, each gradient fractions collected from the bottom after centrifugation. Lane 16, heavy SR vesicles.

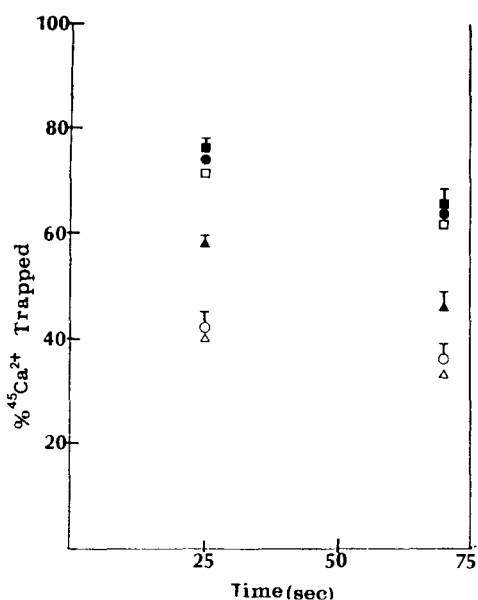
### Channel Protein의 생화학적 특성 조사

$Ca^{2+}$  release channel protein에 미치는 인삼의 효능을 조사하기에 앞서 분리된 heavy SR vesicle막 내에  $Ca^{2+}$  release channel protein의 존재 및 양 그리고  $Ca^{2+}$  channel의 활성을 조사, 확인하는 것은 매우 중요하므로 이들을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하여 Fig. 1과 Fig. 2의 결과를 얻었다.

i) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; differential과 sucrose gradient centrifugation 방법에 의해 분리된 heavy SR에  $Ca^{2+}$  channel protein이 존재하고 있음을 Fig. 1의 lane 16에서 잘 볼 수 있다. 서론에서 소개된 바와 같이  $Ca^{2+}$  channel protein의 monomer 크기가 약 500 Kda인 homotetramer이므로 5~12% SDS-PAGE gel상에서 거의 맨 위부분에 위치하게 되며, 이러한 결과는 Lai 등<sup>25)</sup>과 이 등<sup>26)</sup>의 heavy SR 막의 SDS-PAGE의 gel상 결과와 잘 일치하고 있었으며, 이 protein의 순수분리 후 band들 (lane 2~5)과 비교해 보면 더욱 확실하게 확인할 수 있다. 3% stacking gel과 separating gel 사이의 희미한 band는 가끔 생기며 SDS에 의하여 변성이 완전하

지 않아서 나타난 것으로 여겨진다.

ii)  $Ca^{2+}$  release 측정; heavy SR막에 존재하는  $Ca^{2+}$  channel이 활성을 가지고 있는가를 알기 위하여 이 channel를 통한  $Ca^{2+}$  ion의 이동을 정량적으로 조사하였다. 500  $\mu$ M  $^{45}Ca^{2+}$  (400  $\mu$ M free  $Ca^{2+}$ )을 2시간 동안 passive하게 loading한 후  $Ca^{2+}$  channel 억제자들(고농도의 EGTA와  $Mg^{2+}$  그리고 ruthenium red)을 함유한 용액(quench용액) 과  $Ca^{2+}$  channel 활성(50  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ )화 용액(release 용액)을 이용하여 25초와 70초 후에 heavy SR vesicles내 남아 있는  $^{45}Ca^{2+}$  ion의 양을 ultrafiltration 방법을 이용하여  $Ca^{2+}$  ion 방출을 조사한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 25초 후 거의 반 정도가 방출되고 있음을 볼 때  $Ca^{2+}$  channel이 기능을 잘하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 사실을 더욱 확인하기 위하여 서론에서 소개한 바와 같이 ryanodine의 nM농도에서  $Ca^{2+}$  channel이 open(활성화)되며  $\mu$ M 이상 농도에서는 close(억제)된다고 알려져 있기 때문에 ryanodine 100 nM과 200  $\mu$ M을 각각 첨가 후 활성과 억제를 조사한 결과도 Fig. 2에서와 같이 100 nM ryanodine



**Fig. 2.**  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux from heavy SR vesicles. Heavy SR vesicles were incubated for 30 min at  $23^\circ\text{C}$  with  $0.5\text{ mM } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ , followed by incubation for an additional 90 min at  $23^\circ\text{C}$  in the absence ( $\bullet, \circ$ ) or presence of  $100\text{ nM}$  ( $\blacktriangle, \triangle$ ) or  $200\text{ }\mu\text{M}$  ( $\blacksquare, \square$ ) ryanodine.  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux was initiated by diluting vesicles 75-fold into efflux media containing either  $10\text{ mM Mg}^{2+}$ ,  $50\text{ }\mu\text{M}$  ruthenium red, and  $2\text{ mM}$  EGTA (closed symbols) or  $50\text{ }\mu\text{M}$  free  $\text{Ca}^{2+}$  (open symbols). Amounts of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  remaining with the vesicles at 25 and 70 s after dilution were determined by filtration as described under "Experimental Procedures" (S.E.,  $p < 0.001$ ,  $n=8$ ).

첨가시 quench용액 처리 25초 후 남아있는  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  양이 감소된 것으로 볼 때  $\text{Ca}^{2+}$  channel이 활성화되었음을 알 수 있으며,  $200\text{ }\mu\text{M}$  ryanodine 첨가시 release용액 처리 25초 후 남아있는  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  양의 증가는  $\text{Ca}^{2+}$  channel의 억제를 잘 나타내고 있다. 이러한 결과는 이 등<sup>26)</sup>의 결과와 잘 일치하고 있다.

iii) Ryanodine binding 조사; ryanodine receptor (RyR) -  $\text{Ca}^{2+}$  release channel complex protein이라 불리우는  $\text{Ca}^{2+}$  channel이 specific하게 ryanodine과 binding하므로 [ $^3\text{H}$ ] ryanodine을 이용하여 분리된 heavy SR vesicle내의 RyR에의 binding을 조사한 결과 Kd값이 서론에서 제시된 바와 같이  $4\sim 200\text{ nM}$  범위내에 있었고(data not shown), 위의 실험에서도

ryanodine 이  $\text{Ca}^{2+}$  channel에 결합하는 것을 간접적으로 알 수 있으며, 또한  $\text{Ca}^{2+}$  channel 순수분리 과정에서 얻어진 Fig. 5에서도  $\text{Ca}^{2+}$  channel이 specific하게 ryanodine과 binding함을 잘 알 수 있다.

이상의 결과들로부터 분리된 heavy SR vesicles에 있는  $\text{Ca}^{2+}$  release channel protein이 변성되지 않고 기능을 잘하고 있음을 알 수 있었고 인삼성분의 영향 조사에 재료로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

## 2. Heavy SR Vesicles의 $\text{Ca}^{2+}$ Release Channel Protein에 대한 인삼성분의 영향

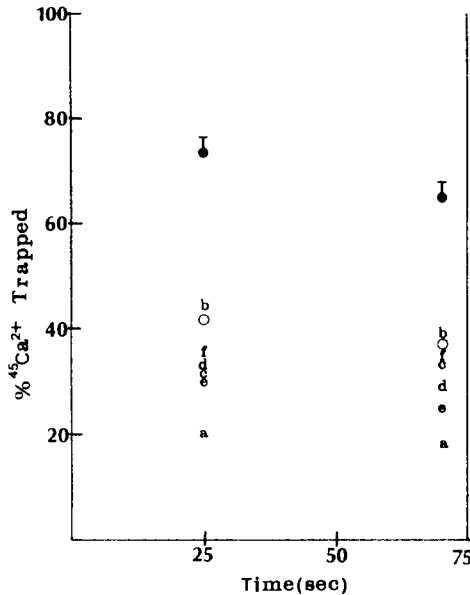
위와 같이 확인된 heavy SR vesicles내에 존재하는  $\text{Ca}^{2+}$  release channel protein에 대한 인삼성분들(total saponins과 ginsenoside Rg<sub>1</sub>)의 영향을 조사하기 위하여 일정량의 Heavy SR vesicle에 인삼성분들을 여러 가지 농도( $10^{-2}\%$ ,  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-4}\%$ ,  $10^{-5}\%$ ,  $10^{-6}\%$ ,  $10^{-7}\%$ )로 넣고  $\text{Ca}^{2+}$  release 정도와 [ $^3\text{H}$ ] ryanodine binding을 조사하였다.  $\text{Ca}^{2+}$  efflux assay 결과는 Fig. 3와 Fig. 4에서와 같이 total saponins과 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 모두  $\text{Ca}^{2+}$  ion의 방출을 전반적으로 촉진시키는 결과를 보여주고 있으며, total saponins 경우  $10^{-4}\%$ 에서, ginsenoside Rg<sub>1</sub> 경우  $10^{-6}\%$ 에서  $\text{Ca}^{2+}$  channel 활성화에 의한 가장 큰  $\text{Ca}^{2+}$  ion 방출을 나타내었다.  $10^{-2}\%$  total saponins 경우(Fig. 3, a)에  $\text{Ca}^{2+}$  channel을 가장 크게 활성화시킨 것으로 나타났지만, 실제 total saponins의 그 농도에서 vesicle들이 용해되어 vesicle내에 남아있는  $\text{Ca}^{2+}$  ion량이 적어서 나타난 결과로서 육안으로 또는 분광광도계를 이용한 turbidity 조사로 알 수 있었다. 주 등<sup>26)</sup>은 인삼 saponins이 일종의 detergent와 같은 역할을 할 수 있다고 보고하였는데, 이러한 사실로부터 여기서 사용된  $10^{-2}\%$  total saponins의 높은 농도에서 용해될 가능성이 있다고 사료된다. 또한 ryanodine binding에 대한 인삼성분의 영향을 조사한 결과는 Table 1에서와 같이 total saponins과 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 모두 ryanodine binding의 억제를 나타내고 있으며, 특히 제일 큰 억제는 total saponin 경우  $10^{-5}\%$ 에서, ginsenoside Rg<sub>1</sub>의 경우는  $10^{-4}\%$ 에서 나타났다. 이러한 사실들은 인삼성분들(total saponins과 ginsenoside Rg<sub>1</sub>)이 heavy SR vesicle의 막에 끼어들어 가서 막의 성질을 바꾸었기 때문이거나 또는  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein에 직접 작용하여 나타난 결과라고 여겨진다.

## 3. 순수 분리된 $\text{Ca}^{2+}$ Release Channel Protein

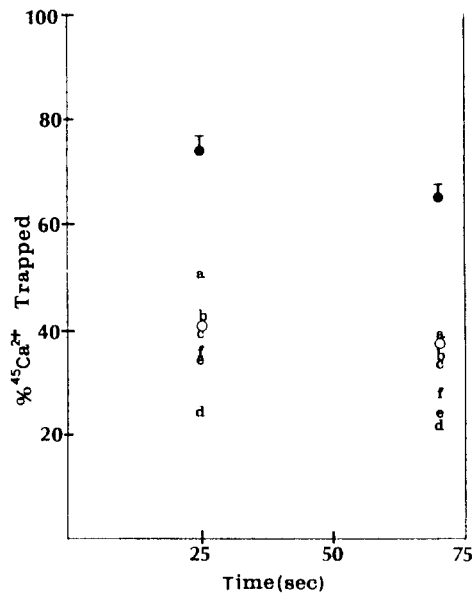
**(RyR)의 확인 및 인삼성분의 영향 조사**

Heavy SR vesicle로부터의 Ca<sup>2+</sup> release channel protein의 순수 분리는 5 mg/ml phospholipid [95% PC, Asolectin]와 zwitterionic detergent인 Chaps 존재하에서 용해시킨 후 원심분리하여 비용해성 불질을 제거하고 Ca<sup>2+</sup> channel protein을 함유하는 상층액을 10~20% sucrose gradient centrifugation을

이용하여 분리하고 일정량씩 밑에서부터 분획 채취한 후 [<sup>3</sup>H]-ryanodine이 처리된 control과 비교(Fig. 5) 하여 한번에 순수분리하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다(Fig. 1). Fig. 5는 Ca<sup>2+</sup> channel protein을 순수분리하기 위하여 Chaps로 용해된 heavy SR vesicle용액에 [<sup>3</sup>H]-ryanodine을 첨가하여 원심분리후 밑에서부터 일정량씩 취했을 때, 각 분획에서의 protein 함량과 방사능 양을 측정된 결과를 보여주고 있다. 2, 3, 4, 5번 분획이 protein량은 적지만 방사성 ryanodine 함량이 높은 것으로 보아, ryanodine receptor라고도 불리워지는 Ca<sup>2+</sup> channel protein이 이곳에 분포되어 있는 것을 알 수 있었고, 또한 각 분획의 단백질 성분을 SDS-PAGE 전기이동 방법으로 조사한 결과(Fig. 1), gel상(lane 2~5)에서 뚜렷하게 한 성분으로 Ca<sup>2+</sup> channel protein이 순수



**Fig. 3.** Effects of total saponins at various kinds of concentration on <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> efflux from heavy SR vesicles. Vesicles were incubated for 120 min at 23°C with 0.5 mM <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>. <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> efflux was initiated by diluting vesicles 75-fold into efflux media containing 50 μM free Ca<sup>2+</sup> (○), 10 mM Mg<sup>2+</sup>, 50 μM ruthenium red, and 2 mM EGTA (●) or 50 μM free Ca<sup>2+</sup> and total saponin at concentrations ranging from 10<sup>2</sup>% to 10<sup>7</sup>% (a~f). Amounts of <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> remaining with the vesicles were determined at 25 and 70 s by filtration as described under "Experimental Procedure" (S.E, p < 0.05, n = 8).



**Fig. 4.** Effects of ginsenoside Rg1 at various kinds of concentration on <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> efflux from heavy SR vesicles. All conditions were the same as Fig. 2.

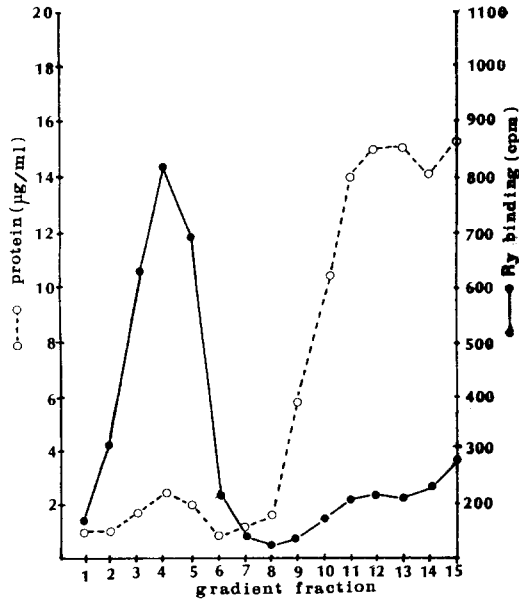
**Table 1.** Effect of ginseng components (total saponins and Rg<sub>1</sub>) at various kinds of concentration on ryanodine binding to Ca<sup>2+</sup> release channel protein in sarcoplasmic reticulum (p < 0.05, n=8)

(Unit : pmol/mg protein)

Ginseng component	0	10 <sup>2</sup> %	10 <sup>3</sup> %	10 <sup>4</sup> %	10 <sup>5</sup> %	10 <sup>6</sup> %	10 <sup>7</sup> %
Total saponins	4.42 ± 0.12	4.17 ± 0.01	4.11 ± 0.11	4.05 ± 0.15	3.89 ± 0.08	4.24 ± 0.10	4.29 ± 0.12
Ginsenoside Rg <sub>1</sub>	3.49 ± 0.11	3.27 ± 0.14	2.53 ± 0.08	2.55 ± 0.08	2.95 ± 0.10	3.34 ± 0.10	3.25 ± 0.13

분리됨을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 앞에서의 결과에서도 언급한 바와 같이 Lai 등<sup>25)</sup>과 이 등<sup>26)</sup>의 Ca<sup>2+</sup> channel protein 순수분리후 SDS-PAGE의 gel 상 결과와 잘 일치하고 있었다. 이러한 control과 비교하여 [<sup>3</sup>H]-ryanodine이 첨가되지 않은 Chaps로 용해된 heavy SR vesicle 용액을 같은 방법으로 원심분

리한 뒤 2, 3, 4, 5번 분획 같은 순수한 Ca<sup>2+</sup> channel protein을 함유한 분획을 얻었다. Fig. 5에서 9번 분획 이상의 분획에서 나타난 방사능은 nonspecific binding과 free form을 나타낸다. 이와 같이 얻은 순수한 Ca<sup>2+</sup> channel protein(RyR)에의 ryanodine binding에 관한 인삼성분들 [ginsenosides(total saponins과 Rg<sub>1</sub>)]의 영향을 여러 가지 농도(10<sup>-2</sup>%, 10<sup>-3</sup>%, 10<sup>-4</sup>%, 10<sup>-5</sup>%, 10<sup>-6</sup>%, 10<sup>-7</sup>%)에서 조사한 결과 Table 2와 같았다. Total saponins과 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 모두 heavy SR(Table 1)에서와 같이 거의 모든 농도에서 ryanodine binding을 억제하는 것으로 나타났다. 가장 큰 억제는 total saponins 경우 10<sup>-4</sup>%에서, ginsenoside Rg<sub>1</sub>의 경우는 10<sup>-5</sup>%에서 나타났다. 이러한 결과는 heavy SR vesicle에 대한 Table 1의 결과와 비교해 볼 때 10배 정도의 높은 농도로서 아마도 detergent가 존재하기 때문으로 사료된다.



**Fig. 5.** Relationship between protein content and [<sup>3</sup>H] ryanodine binding of gradient fraction after sucrose gradient centrifugation. After centrifugation, gradient fractions were fractionated from the bottom.

**4. Reconstituted Vesicle내 Ca<sup>2+</sup> Channel Protein에 미치는 인삼성분의 영향 조사**

일반적으로 막 단백질의 분자적 성질을 조사하는데 가장 좋은 방법은 인공막 내로의 reconstitution으로 알려져 있다. 따라서 Ca<sup>2+</sup> channel protein에 미치는 인삼성분의 영향을 macroscopic scale로 조사하기 위하여 reconstitution을 시도하였다. 위에서 순수분리한, 95% PC와 detergent인 Chaps를 함유한, Ca<sup>2+</sup> channel protein 분획을 dialysis bag(Mol. cut off 10,000)에 넣은 후 4°C 완충 용액하에서 2일 동안 투석하여 detergent를 제거하고 투석액을 원심분리 방법으로 농축한 다음 빠르게 얼렸다 서서히 녹이는 방

**Table 2.** Effect of ginseng components (total saponins and Rg<sub>1</sub>) at various kinds of concentration on ryanodine binding to Chaps-solubilized and purified Ca<sup>2+</sup> release channel (p < 0.05, n=8)

Ginseng component	(Unit : pmol/mg protein)						
	0	10 <sup>-2</sup> %	10 <sup>-3</sup> %	10 <sup>-4</sup> %	10 <sup>-5</sup> %	10 <sup>-6</sup> %	10 <sup>-7</sup> %
Total saponins	5.01±0.20	4.86±0.15	4.61±0.16	4.04±0.11	4.19±0.16	4.85±0.18	4.59±0.21
Ginsenoside Rg <sub>1</sub>	4.76±0.25	4.55±0.23	3.65±0.18	3.85±0.17	3.82±0.19	4.43±0.22	4.28±0.24

**Table 3.** Effect of ginseng components (total saponins and Rg<sub>1</sub>) at various kinds of concentration on ryanodine binding to Ca<sup>2+</sup> release channel protein incorporated into liposome (p < 0.05, n=6)

Ginseng component	(Unit : pmol/mg protein)						
	0	10 <sup>-2</sup> %	10 <sup>-3</sup> %	10 <sup>-4</sup> %	10 <sup>-5</sup> %	10 <sup>-6</sup> %	10 <sup>-7</sup> %
Total saponins	64.8±4.6	54.9±3.6	59.8±3.3	46.4±2.1	44.9±2.4	47.7±3.9	50.6±3.4
Ginsenoside Rg <sub>1</sub>	69.8±2.8	58.5±2.4	44.9±1.7	41.4±2.4	59.3±1.6	64.5±1.9	60.9±1.9

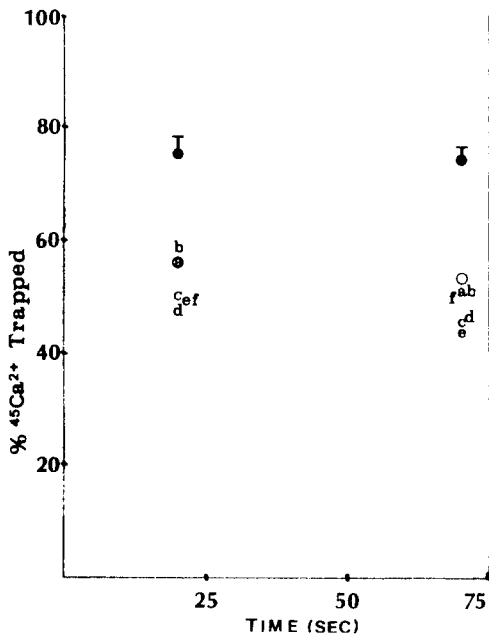


Fig. 6. Effects of total saponin at various kinds of concentration on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux from reconstituted vesicles. All conditions were the same as Fig. 3.

법을 통하여 background permeability를 없애고, 사용 전에 짧게 sonication한 후 얻은 재조합 vesicles을 가지고 위에서와 같이 ryanodine binding assay와  $\text{Ca}^{2+}$  efflux assay를 수행한 결과는 Table 3과 Fig. 6 그리고 Fig. 7에서 볼 수 있다. 재조합 proteoliposome의  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein에 대한 ryanodine의 binding에 미치는 인삼성분 [ginsenosides (total saponins과  $\text{Rg}_1$ )]의 영향을 여러 가지 농도 ( $10^{-2}\%$ ,  $10^{-3}\%$ ,  $10^{-4}\%$ ,  $10^{-5}\%$ ,  $10^{-6}\%$ ,  $10^{-7}\%$ )에서 조사한 결과(Table 3)는 앞에서 조사된 heavy SR vesicles에 대한 결과나 Chaps로 용해된 후 순수분리된  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein에 대한 결과와 마찬가지로 모든 농도에서 ryanodine binding 억제 현상을 나타내었으며, 최고 억제는 heavy SR vesicle에서와 마찬가지로 각각 total saponins 경우  $10^{-3}\%$ 와 ginsenoside  $\text{Rg}_1$  경우  $10^{-4}\%$ 에서 나타났다. 재조합 vesicles을 이용한 ryanodine binding(Table 3) 값이 큰 이유는 효소의 순수분리시 specific activity가 증가하는 것과 마찬가지로  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein이 순수분리되었기 때문이다. 한편, 순수한  $\text{Ca}^{2+}$  channel

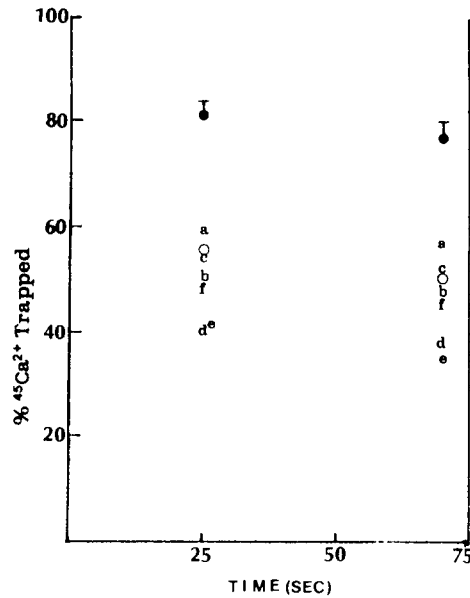


Fig. 7. Effects of ginsenoside  $\text{Rg}_1$  at various kinds of concentration on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux from reconstituted vesicles. All conditions were the same as Fig. 3.

protein이 재조합된 proteoliposome으로부터  $\text{Ca}^{2+}$  efflux에 대한 인삼성분 [ginsenosides (total saponins과  $\text{Rg}_1$ )]의 영향을 조사한 결과는 Fig. 6과 Fig. 7에서와 같이 두 성분 모두 전반적으로 heavy SR vesicle에서와 마찬가지로 재조합 vesicle로부터  $\text{Ca}^{2+}$  ion의 방출을 증가시킴을 나타내었다. 이러한 결과들은 분자수준에서 살펴볼 때, 앞에서 heavy SR vesicle에서 언급한 바와 같이, 인삼성분들은 구조적으로 분자내에 친수성과 소수성 부분을 함께 가지고 있어 막에 끼어들어갈 수 있기 때문에 막성분의 변화가  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein의 분자적 성질을 변화시켜서 나타낸 현상이거나, 비록 soluble protein에 대한 것 이지만 인삼성분이 적절 농도하에서 비특이적으로 여러 가지 탈수소 효소들의 활성을 촉진시켰다는 주 등<sup>2)</sup>의 주장과 함께 인삼성분들이 yeast alcohol dehydrogenase의 구조를 변화시킴<sup>3)</sup>을 보고한 바와 같이 홍삼성분 [ginsenosides(total saponins과  $\text{Rg}_1$ )]이  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein(RyR)의 conformation을 변화시켜 ryanodine binding을 억제하고  $\text{Ca}^{2+}$  ion의 방출을 증가시켰을 것으로 예상된다.

본 연구는 서론에서 소개한 바와 같이, 중추신경계



의 흥분작용과 함께 흰 쥐에서의 활동력 증대, 위장관, 혈관, 자궁 등 여러 가지 평활근에 대한 항진작용, 수영 시간의 연장 등 육체적 인내력을 증대시킴으로써 피로 출현 기간을 연장시키고 노동력을 향상시켰다는 항 피로작용 등에 대한 인삼성분(특히 Rg<sub>1</sub>)의 보고된 영향을 골격근 운동에 직접 관여하는 Ca<sup>2+</sup> channel protein(RyR)을 순수분리하여 홍삼성분(total saponins과 Rg<sub>1</sub>)의 영향을 분자수준에서 확인, 조사한 결과이다.

## 요 약

중추신경계나 위장관이나 혈관 또는 자궁 등의 평활근 수축에 영향이 있다고 알려진 인삼성분 [ginsenosides(total saponins, Rg<sub>1</sub>)]이 Ca<sup>2+</sup> 이온의 세포내 농도 변화 그리고 근육의 수축과 이완에 직접 관여하는 근육 소포체(SR) 막 단백질인 ryanodine receptor (RyR)-Ca<sup>2+</sup> release channel complex protein에 어떤 영향이 있는가를 분자 수준에서 이해하기 위하여 heavy SR vesicle, 순수 분리된 Chaps로 용해된 이 단백질 그리고 dialysis와 freezing-thawing 방법을 이용하여 만든 이 단백질 함유 재조합 vesicle을 가지고 ryanodine 결합과 Ca<sup>2+</sup> 이온의 방출을 조사한 결과, 이들 인삼성분이 Ca<sup>2+</sup> release channel protein에 직접 결합하여 근육의 수축과 이완을 억제하는 ryanodine의 결합을 전체 농도범위(10<sup>-2</sup>~10<sup>-7</sup>%)에서 억제하며 최대 억제가 heavy SR vesicle, 순수분리된 단백질 그리고 재조합 vesicle에서 total saponins 경우 각각 10%, 10%, 10% 이었고 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 경우 각각 10%, 10%, 10%이었으며, 또한 heavy SR과 재조합 vesicle의 Ca<sup>2+</sup> release channel protein을 통한 Ca<sup>2+</sup> ion의 방출에 대한 인삼성분(total saponins과 Rg<sub>1</sub>)의 영향은 전반적인 증가 양상을 보였으며 10<sup>-2</sup>~10<sup>-6</sup>에서 대체로 최대 방출을 나타내었다. 이러한 결과는 이들 인삼성분에 의한 ryanodine receptor(RyR)-Ca<sup>2+</sup> release channel complex protein의 구조적 변형 때문인 것으로 여겨진다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국담배인삼공사의 1995년도 용역연구

비 지원 사업에 의해 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

1. Oura, H., Nakashima, S., Tsukada, T. and Ohita, Y. : *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 980 (1972).
2. 주충노 : 연세논총, **10**, 487 (1973).
3. Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V. : *Ann. Rev. Pharmacol.* **9**, 419 (1969).
4. Takagi, K., Saito, H. and Nabata, H. : *Jap. J. Pharmacol.* **22**, 245 (1972); **22**, 339 (1972).
5. Hong, S. A., Park, C. W., Kim, J. H., Chang, H. K., Hong, S. K. and Kim, M. S. : *Proceedings of International Ginseng Symposium*, p. 33 (1974).
6. Rueckert, K. H. : *Proceedings of International Ginseng Symposium*, p. 59 (1974).
7. Saito, H. and Lee, Y. : *Proceedings of the 2nd International Ginseng Symposium*, p. 109 (1978).
8. Sterner, W. : *Arz. Forsh.* **19**, 1664 (1969).
9. Kitagawa, H. : *Folia Pharmacol. Japan.* **59**, 348 (1963).
10. Takagi, K. : *Jap. J. Pharmacol.* **24**, 41 (1974).
11. Saito, H. : *Jap. J. Pharmacol.* **24**, 119 (1974).
12. Park, D. I. : *Korean J. Med.* **5**, 1003 (1960).
13. 이광수 : 제3차 국제인삼 심포지움, p. 18 (1980).
14. 안광훈 : *중앙의학*, **1**, 6 (1961).
15. Peachy, L. D. and Franzini-Armstrong, C. : *Handbook of Physiology*, Peachey, L. D., Adrian, A. and Geiger, S. R., eds., Section 10, p. 23, American Physiol. Soc., Bethesda, MD. (1983).
16. Inesi, G. : *Ann. Rev. Physiol.* **47**, 573 (1976).
17. Brandl, C. J., Green, N. M., Korczak, B. and MacLennan, D. H. : *Cell*, **44**, 579 (1986).
18. Ebashi, S. : *Ann. Rev. Physiol.* **38**, 293 (1976).
19. Endo, M. : *Physiol. Rev.* **57**, 71 (1977).
20. Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Hanaoko, M., Hirose, T. and Numa, S. : *Nature*, **339**, 439 (1989).
21. Lai, F. A. and Meissner, G. : *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 227 (1989).
22. Lattanzio, F. A., Schlatterer, R. G., Nicar, M., Campbell, K. P. and Sutko, J. L. : *J. Biol. Chem.*

- 262**, 2711 (1987).
23. Rousseau, E., Smith, J. S. and Meissner, G. : *Am. J. Physiol.* **253**, C364 (1987).
24. Meissner, G., Darling, E. and Eveleth, J. : *Biochemistry*, **25**, 236 (1986).
25. Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., Lia, Q. and Meissner, G. : *Nature*, **331**, 315 (1988).
26. Lee, H. B., Xu, L. and Meissner, G. : *J. Biol. Chem.* **269**, 13305 (1994).
27. Meissner, G. : *J. Biol. Chem.* **2159**, 2365 (1984).
28. Laemmli, U. K. : *Nature*, **227**, 680 (1970).
29. Kaplan, R. S. and Pederson, P. L. : *Anal. Biochem.* **150**, 97 (1985).
30. Joo, C. N. : *Proceedings of the 2nd International Ginseng Symposium*, p. 115 (1978).
31. Kim, J. W. and Joo, C. N. : *Korean Biochem. J.* **18**, 279 (1985).