

## 택사(*Alismatis Rhizoma*) trypsin inhibitor의 정제와 특성

박종옥\* · 이인섭<sup>1</sup>

\*경성대학교 화학과

<sup>1</sup>경성대학교 생물학과

### Purification and Characterization of Trypsin Inhibitor from *Alismatis Rhizoma*

Jong Ok Park\* and In-sup Lee<sup>1</sup>

\*Department of Chemistry, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

<sup>1</sup>Department of Biology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

#### Abstract

A trypsin inhibitor was isolated and purified from *Alismatis Rhizoma* which has been used as a galenic for diuretic and antiphlogistic. Purification was carried out by 0-80% saturated ammonium sulfate salting out, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration. The molecular weight of *Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitor(ARTI) was estimated to be about 23,000 Da by gel filtration and SDS-PAGE, it must be monomer. ARTI was stable at 0~60°C, but at higher temperature its activity was decreased about 35%. When benzoyl-dl-arginine p-nitroanilide was used as a substrate of trypsin, half-maximal inhibition of ARTI was observed at 0.071 μM. ARTI inhibited the hydrolysis of trypsin non-competitively and Km value was 0.81 μM.

**Key words** – *Alismatis Rhizoma*, trypsin inhibitor, *Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitor(ARTI)

#### 서 론

단백질 가수분해 효소인 protease는 동식물, 미생물 등에 넓게 분포되어 있으며 촉매부위에 있는 아미노산잔기의 특성에 따라 cystein, serine, aspartic 그리고 metallo protease로 분류할 수 있다[8].

Trypsin, chymotrypsin, plasmin, kallikrein, elastase, cathepsin G, factor B, factor IXa 등등은 serine protease에 속하며 생체내에서 소화, 혈액응고, 섬유소분해, complement activation, 호르몬의 생성과 분해, 배란과 수정, phagocytosis,

kinin system등에 관여하고 있다[14]. 이와 같이 serine protease는 생리적으로 매우 중요한 것이지만 또한 잠재적 위해성도 가지고 있다. 이들 효소의 조절이 잘 이루어지지 않을 경우에는 세포나 조직의 단백질성분이 파괴되어 폐기종, 성인의 호흡곤란증, 췌장염 등과 같은 질병을 일으킬 수 있다[15]. 혈장 내 단백질의 10%가 protease inhibitor라는 사실은 이러한 위해성을 암시하고 있는 것이다. Protease의 작용을 억제하는 물질인 protease inhibitor는 생체내에서 비정상적으로 증가한 protease와 결합하여 이를 불활성화시킨 다음 phagocytosis에 의해 분해함으로써 혈장내의 protease양을 조절하고 또한 proenzyme의 활성화를 조절한다고 알려져 있다[5]. Trypsin은 polypeptide 사슬중의 lysine 이나 arginine잔기에서 유래된 카르복시기를 가진 펩티드를

\*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 051-620-4633, Fax : 051-627-4115

E-mail : gopark@star.kyungsoong.ac.kr

가수분해하는 효소이다. Trypsin의 작용을 억제하는 trypsin inhibitor (TI)로 organophosphorus compounds[3,7], sulphonyl fluorides[2], N-substituted saccharin[17], 3,4-dichloroisocoumarin[6] 등등과 같은 유기화합물들에 대하여는 많이 연구되어 있다.

Kunitz와 Northrop[9] 의해 소의 췌장으로부터 TI가 처음으로 분리된 이후 동식물조직에서 다양한 특성을 갖는 단백질성 물질인 TI들이 여러 가지 발견되어 왔다[11].

우리나라는 많은 수의 생약과 식물을 한방진료의 목적에 사용할 뿐만 아니라 민간약으로, 그리고 식용으로 섭취하고 있다. 이러한 천연 약물 및 식물에는 다양한 생리활성물질이 존재할 것이므로 활발히 연구함으로써 보다 과학적인 근거를 제시하는 것이 중요하다. 이러한 의미에서 한방재료들은 신약의 발굴대상으로 연구자의 관심이 높다.

택사(*Alismatis Rhizoma*, AR)는 택사과(Alismataceae)식물로서 세계적으로 약 13속 90여종이 분포되어 있고 우리나라와 중국에서 많이 생산되고 있다. 택사는 예로부터 이수(利水), 삼습(滲濕), 설열(泄熱) 효능이 있어 이뇨제, 소종제(消腫劑), 설사제로 이용되며 택사탕, 보기건중탕(補氣建中湯), 오령산(五苓散), 복령택사탕, 저령탕(豬苓湯) 등에 배합되어 사용된다[18]. 택사로부터 lectin을 분리, 정제하여 그 특성이 보고된 바 있고[14], 택사 추출물이 항균 및 항산화 효과가 있음이 보고되기도 하였다[16].

본 연구는 택사로부터 새로운 생리활성물질을 분리하고자 하였으며 그 가운데 trypsin inhibitor를 분리, 정제하여 그 특성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

실험에 사용한 택사(*Alismatis Rhizoma*)는 부산 중앙동 한방 재료 시장에서 구입하여 사용하였다. 시약으로 dimethylsulfoxide, tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, N $\alpha$ -benzoyl-dl-arginine p-nitroanilide(BAPNA), trypsin(from porcine pancreas), trypsin inhibitor(from soybean), bovine serum albumin, DEAE-cellulose, Sephadex G-150, Gel-filtration molecular weight marker 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)와 Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA) 제품을 사용하였고 기타 다른 시약은 특급제품을 사용하였다.

### AR trypsin inhibitor의 분리 및 정제

분말로 만든 택사 50 g에 25 mM tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 500 ml를 가한 다음 4°C에서 하룻 동안 저어 주면서 방치한 후 Potter-Elvehjem homogenizer로 균질화하였다. 균질화된 용액을 20,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 추출물로 하였다. 이 추출물에 고체 (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ 를 천천히 교반하면서 가하여 80% 포화시켰다. 30분간 방치한 후 20,000×g에서 10분간 원심분리하여 80% 포화침전물을 얻어 SO $_4^{2-}$ 이온이 검출되지 않을 때까지 25 mM tris-HCl 완충용액(pH 7.4)으로 투석하였다. 투석이 완료된 추출물을 25 mM tris-HCl 완충용액(pH 7.4)으로 미리 평형시켜 둔 DEAE-cellulose column (3×41 cm)에 주입하여 같은 완충용액으로 용출시켜 파장 280 nm에서 용출액의 흡광도가 완충용액과 같아질 때까지 씻어 주었다. 이 column을 0~1 M NaCl의 염농도 linear gradient하여 용출시켜 trypsin 저해 활성이 있는 분획들을 모아 농축시켰다. 위의 농축액을 25 mM tris-HCl 완충용액(pH 7.4)으로 미리 평형시켜 둔 Sephadex G-150 column (2.2×83 cm)에 주입한 후 같은 완충용액으로 용출시켜 활성이 있는 분획을 모아 농축하였다. 위의 Sephadex G-150 column chromatography는 한 번 더 시행하여 활성분획을 모아 농축시켜 ARTI(*Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitor)라 하였다. 이상의 모든 실험 조작은 4°C에서 행하였다. 농축액은 Bio-Gel P-6 column (1.6×60 cm)에서 탈염한 다음 각종 실험에 사용하였다.

### 순도 확인 및 단백질 정량

앞 실험에서 얻어진 trypsin inhibitor의 순도확인을 위해 Davis 등[4]의 방법에 따라 12% polyacrylamide gel electrophoresis를 시행하였다. 이 때 흘려 준 전류는 10 mV였고, 약 3시간 동안 전기영동한 후 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 용액으로 염색하였다. 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 등[12]의 방법으로 정량하였다.

### 분자량 측정

Gel filtration; 정제된 trypsin inhibitor의 분자량은 Sephadex G-150 column (1.6×88 cm)을 사용하여 Andrews[1] 방법으로 측정하였다. 표준 단백질로는 aldolase(153,000), bovine serum albumin(66,000), carbonic anhydrase(29,000),

cytochrome C(12,400) 등을 사용하였다.

SDS PAGE; subunit수와 그 분자량을 알기 위하여 Laemmli[11]방법에 따라 전기영동하여 측정하였다. Separating gel의 polyacrylamide 농도는 12%였으며 standard protein 은 hen egg white conalbumin(76,000), bovine serum albumin(66,000), hen egg white albumin(45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000), trypsinogen (25,000), soybean trypsin inhibitor(20,500) 등을 사용하였다.

### ARTI의 저해 활성 측정

Trypsin inhibitor 저해 활성 시험은 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 0.1 M tris-HCl 완충용액 1.1 ml, trypsin 용액 (1 mg/ml in 5 mM HCl containing 5 mM CaCl<sub>2</sub>) 0.03 ml, inhibitor용액 0.03 ml를 섞은 혼합액에 기질 BAPNA(5 mg/ml in dimethylsulfoxide) 0.1 ml을 섞은 후 37°C에서 10분간 반응시키고 20% acetic acid 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Inhibitor의 저해능은 trypsin이 기질을 완전히 분해하였을 때에 대한 백분율로 나타내었다.

### ARTI의 온도에 따른 안정성

앞에서 설명한 저해 활성 측정법에 따라 ARTI를 5°C, 25°C, 37°C, 60°C, 80°C, 100°C 등의 다양한 온도에서 10분간 반응시킨 후 trypsin에 대한 저해 활성을 측정하였고 inhibitor가 들어있지 않은 대조군과 비교하였다.

### ARTI의 농도변화에 따른 trypsin의 저해능

ARTI의 여러 가지 농도에 따르는 trypsin의 저해능을 알아보고 또한 상품화된 대두의 Kunitz trypsin inhibitor와의 저해능을 비교해 보기 위하여 ARTI 및 soybean trypsin inhibitor의 용액 농도가 2 mg/ml되게 한 용액을 5 μl, 10 μl, 20 μl, 30 μl, 40 μl, 50 μl 씩 각 반응용액 중에 첨가하여 앞에서 설명한 저해 활성 측정법에 따라 시행하였다.

### ARTI의 trypsin에 대한 저해형 결정

ARTI가 trypsin에 대하여 어떤 형태의 저해반응을 일으키는 지 알아보기 위하여 기질인 BAPNA의 농도 및 inhibitor의 농도를 변화시켜 효소의 활성을 측정하여 알아보았다. 먼저 trypsin의 BAPNA에 대한 가수분해 반응속도를 측정

하였다. 즉 기질(BAPNA)의 농도를 여러 가지로 변화시켜서 앞에서 설명한 저해 활성 실험을 시행한 후 그 반응속도 (10분 동안 반응용액에서 생성된 p-nitroaniline(PNA)의 μ mole수)를 측정하여 Lineweaver-Birk방법으로 도시하여 trypsin의 BAPNA에 대한 V<sub>max</sub>와 K<sub>m</sub>값을 결정하였다. ARTI의 저해형을 결정하기 위하여 정제된 ARTI 일정량을 위의 각 반응용액에 함께 첨가하여 그 때의 반응속도를 측정 한 후 마찬가지로 방법으로 V<sub>max</sub>와 K<sub>m</sub>값을 구하여 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### ARTI의 분리 및 정제

택사로부터 ARTI를 황산암모늄을 이용한 염석법, DEAE-cellulose ion exchange chromatography(Fig. 1), Sephadex G-150을 이용한 gel filtration chromatography(Fig. 2) 등을 행하여 정제한 결과를 Table 1에 나타내었다.

Crude extract로부터 60.6배 정제되었고 9.85%의 회수율을 나타내었으며 전기 영동한 결과 하나의 밴드가 나타나 (Fig. 3) 순수하게 정제되었음을 알 수 있었다.

### 분자량

ARTI의 분자량은 Sephadex G-150 gel filtration 행한 결과 약 23,000 Da으로 나타났으며(Fig. 4), SDS-PAGE 전기영동한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 약 23,000 Da으로 나

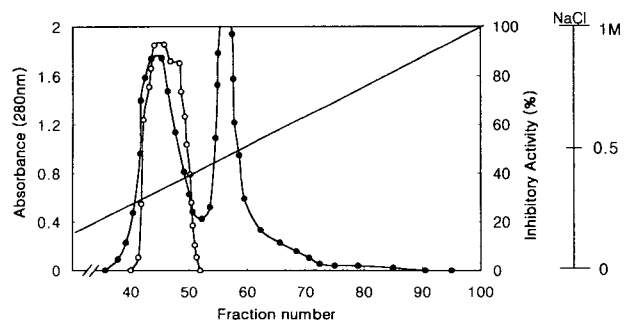


Fig. 1. DEAE-cellulose ion-exchange chromatogram of *Alismatis Rhizoma* trypsin inhibitor.

The inhibitor sample obtained by ammonium sulfate precipitation was applied on a DEAE-cellulose column in 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and eluted with a linear gradient of NaCl(0~1 M in the same buffer) at a flow rate of 20 ml/hr

●: absorbance at 280 nm, --- : NaCl concentration  
▲: inhibitory Activity

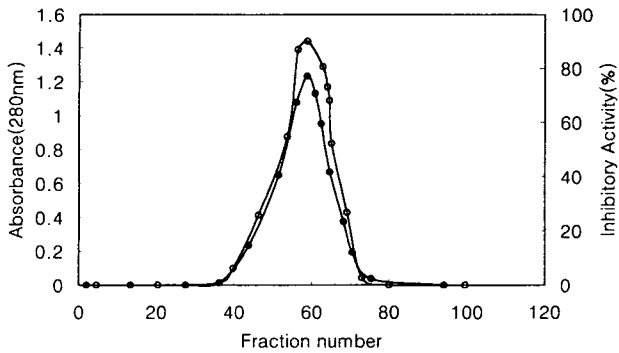


Fig. 2. Gel filtration chromatogram of ARTI.

The inhibitor fraction obtained from DEAE-cellulose was chromatographed on a Sephadex G-150 column (1.6×88 cm) equilibrated with 25 mM tris buffer(pH 7.4) at flow rate of 10 ml/hr

■: trypsin inhibitory activity of ARTI ○: absorbance at 280 nm

타나 monomer로 되어 있음을 알 수 있었다. Trypsin inhibitor의 분자량과 subunit의 수나 그 분자량은 매우 다양하며 subunit의 수도 monomer에서부터 oligomer로 이루어져 있는 것까지 있으며 한 종류의 subunit으로 되어 있는 것에서부터 여러 종류의 subunit가 모여 분자를 이루고 있는 것으로 보고되어 있다. 이러한 차이는 생물종의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

온도에 대한 안정성

온도에 따르는 trypsin에 대한 ARTI의 저해활성은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 60℃까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 저해능이 떨어지기 시작하였다. 그러나 80℃이상 100℃에서도 35%정도의 저해활성을 나타내어 고온에서는 약간 불안정한 것으로 나타났다. 일반적으로 trypsin

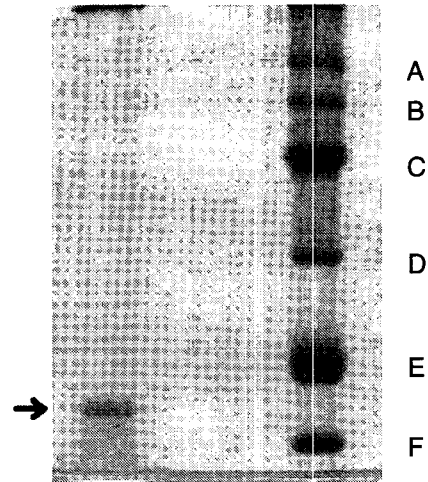


Fig. 3. Electrophoretogram of purified ARTI on SDS-polyacrylamide gel.

The marker proteins were:

- A: hen egg white conalbumin (76,000)
  - B: bovine serum albumin(66,000)
  - C: hen egg white ovalbumin(45,000)
  - D: rabbit muscle GAPDH (36,000)
  - E: trypsinogen(25,000)
  - F: soybean trypsin inhibitor(20,500)
- ➡: ARTI

inhibitor들은 저온에서는 안정하나 고온에서는 불안정하다고 보고되어있다. 예를 들어 쌀의 trypsin inhibitor는 90℃에서 10분 가열할 때 저해 활성도가 감소하기 시작하여 1시간 이상 가열하면 저해 활성도가 거의 소실된다고 보고되었고 taro trypsin inhibitor는 끓는 물에서 10분~20분 후 저해 활성이 거의 소실된다고 보고 되었다. 그러나 E. coli에서 정제된 protease inhibitor는 100℃에서도 30분 동안은 안정하다고 보고되었다.

Table 1. Purification of trypsin inhibitor from *Alismatis Rhizoma*

Purification steps	Total protein(mg)	Total <sup>1)</sup> units	Specific activity (units/mg protein)	Purification (folds)	Recovery (%)
crude extract	3880	8294	2.14	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitates	261	3747	14.36	6.71	45.18
DEAE-cellulose	36.8	1891	51.39	24.01	22.80
1st Sephadex G-150 gel-filtration	9.4	996	105.96	49.51	12.01
2nd Sephadex G-150	6.3	817	129.68	60.60	9.85

<sup>1)</sup>One unit was defined as the amount of inhibitor that causes the loss of 1 μmol substrate per minute under specified condition

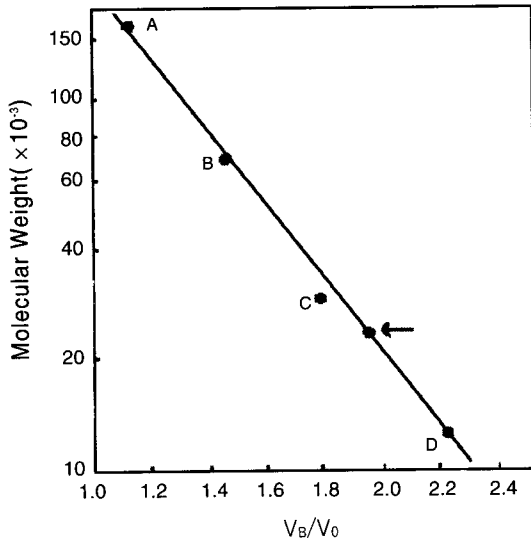


Fig. 4. Molecular weight estimation of ARTI by Sephadex G-150 gel filtration chromatogram.

A: aldolase(153,000), B: bovine serum albumin(66,000)  
C: carbonic anhydrase(29,000), D: cytochrome c(12,400)  
→ : ARTI

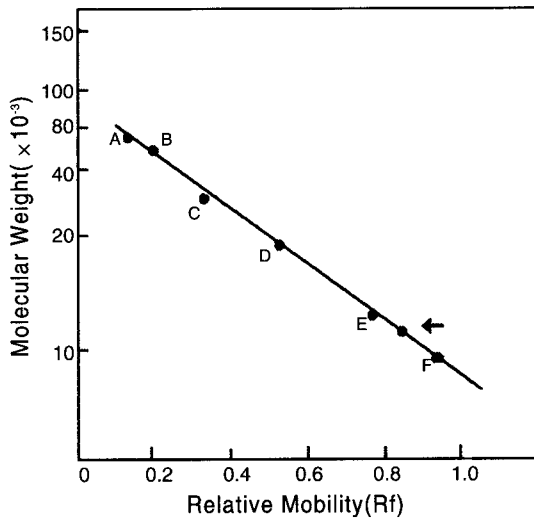


Fig. 5. Molecular weight estimation of ARTI by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A: hen egg white conalbumin(76,000), B: bovine serum albumin(66,000), C: hen egg white ovalbumin(45,000), D: rabbit muscle GAPDH(36,000), E: trypsinogen(25,000) F: soybean trypsin inhibitor(20,500), ←: ARTI

농도에 따르는 저해능

일정 농도의 trypsin에 ARTI 및 soybean inhibitor의 농도를 증가시키면서 저해능을 측정한 결과 Table 2와 같이

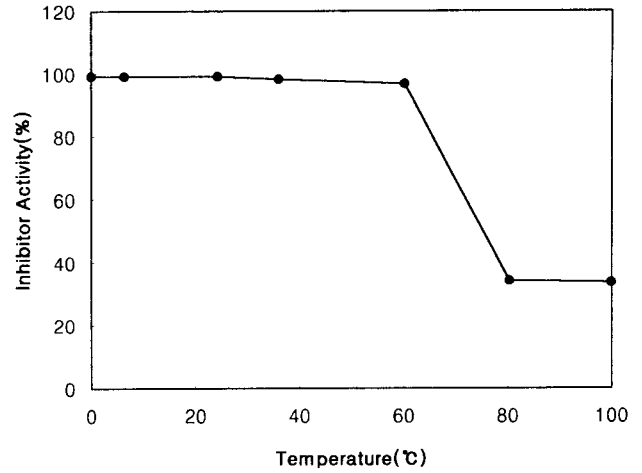


Fig. 6. Thermal stability of the purified ARTI.

After ARTI solution had been incubated at various temperature for 10 min at pH 7.4, the remaining inhibitory activities for trypsin were measured.

Table 2. The inhibitory activity of purified ARTI and commercial soybean trypsin inhibitor with various concentrations

Concentration of inhibitor ( $\mu\text{l}$ ) <sup>*</sup>	Inhibition (%)	
	ARTI	Soybean
5	0	31.7
10	0.6	49.8
20	18.8	82.8
30	41.4	84.2
40	45.4	84.7
50	57.7	84.7

\*Concentrations of used ARTI and soybean inhibitor were 0.2 mg/ml and 2 mg/ml, respectively

나타났다. Trypsin 활성에 대하여 50% 저해능을 나타내는 농도는 ARTI의 경우 1.85  $\mu\text{g}$ (0.071  $\mu\text{M}$ )이었고 soybean inhibitor는 2.0  $\mu\text{g}$ (0.17  $\mu\text{M}$ )이었으므로 ARTI가 soybean inhibitor보다 2.4배정도 강한 새로운 TI를 얻을 수 있었다.

#### ARTI의 trypsin에 대한 저해형 결정

ARTI의 trypsin에 대한 저해형을 결정하기 위해 먼저 trypsin의 BAPNA에 대한 가수분해반응속도를 측정한 다음 Lineweaver-Birk 도식하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 그 결과  $K_m$ 값은 0.81  $\mu\text{M}$ 이었으며  $V_{max}$ 는 1.92  $\mu\text{M}/\text{min}$ 이었다. 저해형을 알아보기 위해 ARTI를 반응용액에 함께 첨가

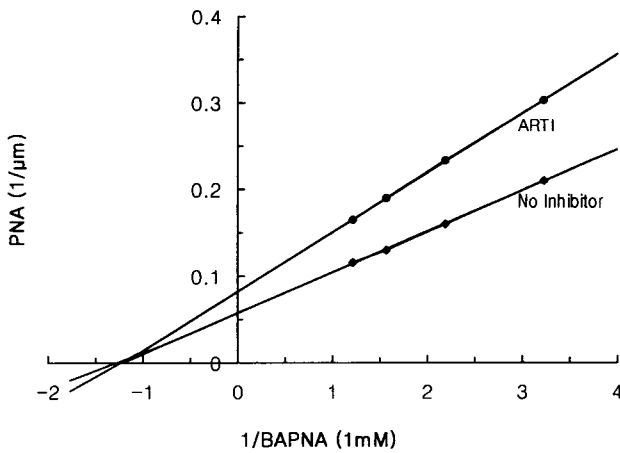


Fig. 7. Inhibition of p-nitroaniline formation by ARTI.

한 후 반응속도를 측정된 결과를 Fig. 7에 같이 실었다. 그림에서 나타난 바와 같이  $V_{max}$ 값은  $1.22 \mu M/min$ 으로 변화하였지만  $K_m$ 값은 불변임을 볼 수 있다. 이 실험결과로부터 ARTI는 trypsin에 대하여 비경쟁적 저해를 하는 것으로 추정할 수 있다. 그러므로 경쟁적 억제작용을 하는 inhibitor와는 다른 조절 작용을 하는 것으로 추정된다.

### 요 약

한방재료의 하나인 택사(*Alismatis Rhizoma*, AR)로부터 단백질 trypsin inhibitor(TI)를 분리, 정제하여 특성을 조사하였다. 정제과정은 0-80% 포화 황산암모늄을 이용한 염석법, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, Sephadex G-150 chromatography 등을 이용하였다. 정제된 ARTI의 분자량을 gel filtration과 SDS-PAGE 한 결과 모두 약 23,000 Da으로 나타나 monomer로 되어 있는 것으로 나타났다.

온도안정성에 있어 0-60°C에서는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 약 35%까지 안정성이 떨어졌다.

ARTI와 상품화된 soybean kunitz inhibitor의 저해능을 비교해 본 결과 ARTI 및 soybean inhibitor 각각의 농도가  $0.071 \mu M$ ,  $1.7 \mu M$ 일 때  $0.025 g/ml$  trypsin 활성을 50% 정도 저해하는 것으로 나타났다.

ARTI의 trypsin의 가수분해반응에 대한 저해형태는 비경쟁적 저해형인 것으로 나타났으며  $k_m$ 값은  $0.81 \mu M$ 이었다.

### 감사의 글

이 논문은 2000학년도 경성대학교 학술지원연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Andrews, P. 1965. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem. J.* **96**, 595-606.
2. Baker, B. R. and E. H. Ericksor. 1969. Irreversible enzyme I inhibitors. CXLIV. Proteolytic enzymes VIII. Additional active site directed irreversible inhibitors of trypsin derived from m- and p- (phenoxyalkoxy)-benzamidines with a terminal sulfonyl fluoride. *J. Med. Chem.* **12**, 112-117.
3. Cohen, J. A., R. A. Oosterbaan and F. Berends. 1967. Organophosphorus compounds. *Method Enzymol.* **11**, 686-702.
4. Davis, B. J. and N. Y. Ann. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Acad. Sci.* **121**, 404-427.
5. Fritz, H., V. Seemuller and H. Tscheche. 1984. Proteinase and their inhibitors, in "Methods of Enzymatic Analysis **55**, General Review.
6. Harper, J. W. and J. C. Powers. 1984. 3-Alkoxy-7-amino-4-chloroisocoumarins : a new class of suicide substrates for serine proteases. *J. Ann. Chem. Soc.* **106**, 7618-7619.
7. Jansen, E. J., M. D. F. Nutting, R. Jang and A. K. Ball. 1949. Inhibition of the proteinase and esterase activation of trypsin and chymotrypsin by diisopropyl-fluorophosphate. Crystallization of the inhibited chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **179**, 189-199.
8. Kassell, B. 1976. Naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *Methods in enzymology part B* **45**, 839-906.
9. Kunitz, M. and J. H. Northrop. 1934. Inactivation of crystalline trypsin. *J. Gen. Physiol.* **17**, 591-615.
10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
11. Laskowaski, M. J. and I. A. Kato. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 593-602.
12. Lowry, S. O., N. J. Resebrough, F. A. Lewis and R. L.

- Nantall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biochem.* **193**, 265-275.
13. Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350-357.
14. Park, J. O., K. S. Kim and K.-O. Sun Woo. 1995. Purification and characterization of hemagglutinating protein from rhizome of *Alisma orientale*. *J. Korea Soc. Food Nutr.* **24**, 587-593.
15. Power J. C. and J. W. Harper. 1986. Inhibitors of serine proteinases. p. 55, in Dingle J. T. and Gordon(eds.) J. L., Research monographs in cell and tissue physiology **12**, elsevier science publishers B. V. (Biomedical Division), amsterdam.
16. Toh, C. A. 1996. Antimicrobial and antifungal studies on *Alisma rhizoma*. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 378-382.
17. Zimmerman, M., H. Morman, D. Mulvey, H. Jones, R. Frankshun and B. M. Ashe. 1980. Inhibition of elastase and other serine proteases by heterocycling acylating agents. *J. Biol. Chem.* **255**, 9848-9851.
18. 김정제. 1985. 현대 한방 연구소편, 현대의 한방 I. **167**, 광복출판문화사. 서울.

(Received February 4, 2002; Accepted April 2, 2002)