

# 삼주의 18S rRNA 유전자의 염기서열 결정, 계통분류학적 분석 및 atractylon 분석

배 영 민<sup>†</sup>

창원대학교 미생물학과

## DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis of the 18S rRNA Gene of *Atractylodes japonica* Koidz and Analysis of Atractylon

Young Min Bae<sup>†</sup>

Department of Microbiology, Changwon University, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea.

**ABSTRACT :** The region containing 18S rRNA gene, ITS 1 and part of the 5.8S rRNA gene of the *Atractylodes japonica* Koidz was amplified by PCR and the product cloned in a pBluescript SK II plasmid. DNA sequence of the cloned DNA was determined and submitted to the GenBank (accession number EU678363). Phylogenetic analysis of the ITS 1 DNA showed close similarity with the other plant species of the family Compositae. The extract of the plant materials of five different members of the family Compositae was analyzed by HPLC to detect atractylon. Extract of the *A. japonica* Koidz showed presence of significant amount of atractylon. However, noticeable amount of atractylon was not detected by the same analyses from the extracts of the other plants belonging to the family Compositae including *Artemisia capillaris*, *Chrysanthemum zawadskii*, *Eclipta prostrata* or *Taraxacum platycarpum*.

**Key Words :** *Atractylodes japonica* Koidz, 18S rRNA, PCR, Phylogenetic Analysis, Atractylon

### 서 언

삼주는 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과 (Compositae)의 여러해살이풀로서 학명은 *Atractylodes japonica*이고, 분포지역은 한국, 중국 동북부, 일본 등지이며 산지의 건조한 곳에서 자란다. 삼주가 속하는 초롱꽃목 국화과 (Compositae)에는 예로부터 약초로 사용되고 있는 것들이 상당히 많다 (Park, 2004; Lee, 2003). 이와 같은 국화과의 약초들 중에서 현재까지도 널리 사용되고 있고, 또한 우리나라 원산 또는 귀화의 과정을 거쳐서 현재 전국에 자생중인 것들로는 구절초 (*Chrysanthemum zawadskii*), 인진쑥 (*Artemisia capillaris*), 국화 (*Chrysanthemum morifolium*), 감국 (*Chrysanthemum indicum*), 뽕국채 (漏蘆, *Rhaponticum uniflorum*), 도꼬마리 (蒼耳子, *Xanthium strumarium*), 영경귀 (大薊, *Cirsium japonicum*), 머위 (款冬花, *Petasites japonicus*), 약쑥 (艾葉, *Artemisia argyi*), 민들레 (蒲公英, *Taraxacum platycarpum*), 홍화 (*Carthamus tinctorius*), 환련초 (*Eclipta prostrata*), 해바라기 (*Helianthus annuus*) 등이 알려져 있다 (Park, 2004; Lee,

2003). 현재 우리나라에서 한약재로 많이 사용되고 있는 白朮은 삼주의 뿌리를 건조시켜서 사용한다 (Heo, 2005).

백출의 효능은 동의보감에 “性溫 味苦甘 無毒 健脾強胃 止瀉除濕 消食止汗 除心下急滿及霍亂吐瀉不止 利腰臍間血 療胃虛冷痢”, 즉 “성질은 따뜻하고 맛이 쓰며 달고, 독이 없고, 비위를 튼튼하게 하고 설사를 멎게 하며 濕을 없앤다. 또한 소화를 시키고, 땀을 거두며 명치 밑이 몹시 그득한 것과 광란으로 토하고 설사하는 것이 멎지 않는 것을 치료한다. 허리와 배꼽 사이의 혈을 잘 돌게 하며 胃가 虛冷하여 생긴 이질을 낫게 한다.”라고 서술되어 있다 (Heo, 2005).

백출은 현재에도 많이 이용되는 八物湯 및 十全大補湯의 재료로 사용되고 있으며 (Heo, 2005), 최근의 논문들에는 백출의 추출액이 항염증작용 (Han *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2004; Resch *et al.*, 2001), CuCl<sub>2</sub>에 대한 해독작용 (Kiso *et al.*, 1985), HIV-1의 활성 억제 작용 (Min *et al.*, 2001), 내부면역체계의 강화 (Sin *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1998) 그리고 ATPase 활성저해 (Sakuri *et al.*, 1993; Satoh *et al.*, 1996) 등의 효능을 가진 것으로 보고되어 있다.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-55-213-3483 (E-mail) yominbae@changwon.ac.kr  
Received October 31, 2008 / Revised January 17, 2009 / Accepted January 28, 2009

백출의 확인된 성분들로는 sesquiterpenoids, 즉 atractylon, atractylonide III, 3β-hydroxyatractylon 그리고 TDDM, (6E, 12E)-tetradecadiene-8,10-diyne-1,3-diol, 6-methyl-2-geranyl-p-benzoquinone 등의 polyacetylene 화합물 등이 보고되어 있다 (Kitajima *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). 백출에 함유되어 있는 이러한 성분들 중에서 약효에 대한 연구가 가장 많이 되어있는 것이 atractylon이다 (Sato *et al.*, 1996; Kitajima *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

생명체들의 진화적 차이 및 서로간의 상관관계를 비교하기 위해서는 현재 원핵생물들은 16S rRNA의 염기서열, 그리고 진핵생물의 경우에는 18S rRNA의 염기서열을 비교하고 있다 (Olsen and Woese, 1993). 다른 과 (family)에 속하는 한약재들의 경우에는 18S rRNA의 염기서열이 알려져 있는 것들도 있지만, 본 연구에서 확인해 본 바에 의하면 현재 국화과의 식물들 중에서는 18S rRNA 유전자의 염기서열이 거의 또는 완전히 알려져 있는 것은 전혀 없다.

따라서 본 연구에서는 국화과 식물인 삼주의 genomic DNA를 추출하고, 계통분류학적 유연관계 해석에 유용하나 현재까지 알려져 있지 않는 삼주의 18S rRNA 유전자, internal transcribed spacer 1 (ITS 1) 그리고 5.8S rRNA 유전자의 염기서열을 밝혀서 GenBank에 등록하였다 (accession number EU678363). 또한 이렇게 얻어진 삼주의 ITS 1의 염기서열을 GenBank에 등록되어 있는 다른 국화과 식물들 중에서 구절초 (*Chrysanthemum zawadskii*), 인진쑥 (*Artemisia capillaris*), 민들레 (*Taraxacum platycarpum*), 한련초 (*Eclipta prostrata*)의 ITS 1의 염기서열과 비교해 보았다. 또한 삼주와 같이 국화과에 속하는 한약재 중에서 현재도 널리 사용되고 있고, 가격이 저렴하며, 쉽게 구할 수 있는 이들 4가지 약용 식물 (구절초, 인진쑥, 민들레, 한련초) 추출액의 atractylon 존재 여부를 HPLC로 분석하여 그 profile을 백출의 profile과 서로 비교해 봄으로써 삼주의 계통학적 위치를 구명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 백출, 구절초, 인진쑥, 민들레, 한련초는 (주)화림제약 (부산시 남구 용호3동 377-3)의 제품을 구매하여 사용하였고, (주)화림제약의 연구실에서 철저하게 동정된 제품을 사용하였다.

### 2. 총 DNA의 분리

건조된 식물체를 A11 basic analytical mill (IKA Works, Inc.)을 이용하여 15-30초 동안 분쇄하였다. 미세하게 분쇄된 분말 0.3 g을 50 ml 용량의 polypropylene tube에 넣고, 직경

**Table 1.** Primers Used for Amplification of the 18S rRNA Gene, ITS 1 and Part of the 5.8S rRNA Gene.

Primer	Sequence
Forward	5'-TTTAGATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
Reverse	5'-TTTAAGCTTCCAAGTATCGCATTTTCGCT-3'

이 0.5 mm 인 glass beads 3 ml 를 첨가하였다. 여기에 4 ml 의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)와 2 ml 의 10% SDS를 첨가하고, 이것을 1분 동안 최고 속도로 vortex하였다. 6 ml 의 phenol:chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 혼합액을 첨가하고 다시 한 번 더 vortex한 후, 이것을 20°C에서 9,700 × g의 원심력으로 SS-34 rotor를 사용하여 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 혼합물로 한 번 더 추출하고, 최종 상등액은 3 M sodium acetate 및 ethanol로 침전시킨 후, pellet을 TE buffer에 녹였다. 이 DNA 용액에 RNase A (2 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 유지시키고, 이것을 Qbiogene의 GeneClean Turbo Kit를 사용하여 정제하였다.

### 3. PCR에 의한 증폭

PCR 반응을 위해서는 DNA template 200 ng, forward primer 2.5 pmol, reverse primer 2.5 pmol, dNTPs mixture 2 μl (10 nM each) 그리고 *Pfu* DNA polymerase 1 μl (3 U)를 포함하는 100 μl의 반응액에서 반응을 진행하였다. PCR 반응에 사용한 forward primer 및 reverse primer는 Table 1 에 표시하였다 (Bae *et al.*, 2006; Wada and Satoh, 1994). Forward primer는 18S rRNA 유전자의 5' 끝 부분에 결합하도록 만들어 졌고, reverse primer는 5.8S rRNA 유전자의 중간 부위에 결합하도록 만들어 졌다 (Bae *et al.*, 2006). 이때에 식물들의 18S rRNA genes에서 존재하지 않는 것으로 알려진 제한효소 *Bgl*II의 인식부위를 forward primer의 5'-말단에 첨가하여서 cloning시에 사용할 수 있도록 하였다. 역시 cloning시에 사용하기 위하여 식물들의 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene 그리고 그 사이의 ITS 1에 존재하지 않는 것으로 알려진 *Hind*III의 인식부위를 reverse primer에 첨가하였다. 반응조건은 94°C에서 2분간 한 cycle, 그리고 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 3분씩 30 cycle을 진행시킨 후, 최종적으로 72°C에서 10분간 반응하였다. PCR에는 error가 많이 발생하는 *Taq* DNA polymerase 대신에 error가 훨씬 적게 발생하는 *Pfu* DNA polymerase를 사용함으로써 반응 중에 DNA sequence가 변경되는 것을 최소화 하였다 (Cline *et al.*, 1996).

### 4. 클로닝 및 염기서열 분석

PCR 산물은 아가로스겔 전기영동으로 분석하여 예상되는

크기의 산물이 생성된 것을 확인한 후에 Promega의 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System으로 정제하였다. 이렇게 정제된 DNA는 *Sma*I로 절단된 pBluescript SK II plasmid와 섞어서 ligation 반응을 진행시킨 후, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competent cell을 형질전환 시키는 데에 사용하였고, 형질전환된 세포들은 ampicillin (100  $\mu$ g/ml)을 함유하는 MacConkey agar plate에 도말되었다. 흰색의 colony들로부터 plasmid DNA를 추출하고, 아가로스겔 전기영동을 통해서 예상되는 크기의 삽입 DNA가 포함되어있는 것을 확인한 후, 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 분석은 (주)바이오닉스(서울특별시 구로구 구로3동 235번지)에 의뢰하였다.

### 5. DNA 염기서열의 계통학적 분석

얻어진 염기서열은 GenBank의 BLAST program 및 Baylor College의 Clustal W 1.83을 이용하여 분석하였다 (Altschul *et al.*, 1997).

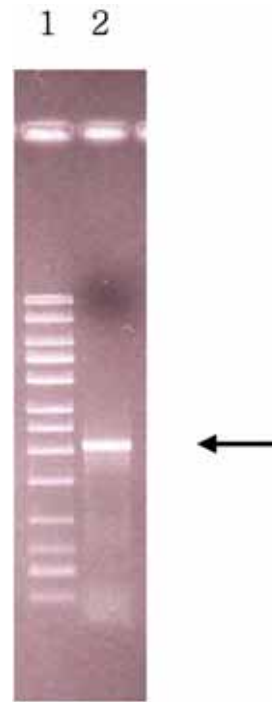
### 6. Atractylon 분석

건조된 삽주, 구절초, 인진쑥, 민들레 및 한련초로부터 atractylon을 추출하여 분석하는 것은 주로 Wang *et al.* (2007)의 방법에 따라 수행되었다. 간단히 설명하면, analytical mill로 분쇄된 식물체 0.5 g에 methanol 10 ml를 첨가하고 40  $^{\circ}$ C에서 30분간 유지시켰다. 이것을 table top centrifuge에서 3,500 rpm으로 5분간 원심분리하고, 그 상등액을 0.45  $\mu$ m의 syringe filter로 여과시켰다. 이 추출액 20  $\mu$ l를 Waters 1525 HPLC로 separation하여 Waters 2487 dual wavelength absorbance detector로 분석하였다. Separation에 사용된 용매로는 acetonitrile과 water (8:2)를 사용하였고 flow rate는 1 ml/min로 하였다. 분석에 사용된 column은 Sunfire column 4.6  $\times$  150 mm 으로서 column의 온도는 40  $^{\circ}$ C로 유지시켰고, 파장 220 nm에서의 absorbance peak들을 확인하여 atractylon의 존재여부를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 18S rRNA, ITS 1 및 5.8S rRNA의 염기서열 분석

삽주 (*Atractylodes japonica* Koidz)의 핵 DNA를 사용하여 PCR을 수행하여 얻어진 PCR 산물을 아가로스겔 전기영동을 통하여 분석한 결과, 예상한 대로 약 2.1-kb의 DNA가 관찰되었다 (Fig. 1). 이것을 pBluescript SK II plasmid에 cloning 하여서 염기서열을 분석하고, 이렇게 얻어진 염기서열을 GenBank에 등록하였다 (accession number EU678363). 삽주로부터 얻어진 염기서열은 18S rRNA 유전자, ITS 1 및 5.8S rRNA 유전자의 일부를 포함하는 2,133-bp로서, G+C 함량은 51.1%로 나타났다.



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of the PCR product. Lane 1, 1kb DNA ladder; Lane 2, PCR product. The lengths of the DNA markers in the 1-kb ladder are 10-kb, 8-kb, 6-kb, 5-kb, 4-kb, 3-kb, 2.5-kb, 2-kb, 1.5-kb, 1-kb, 0.7-kb, 0.5-kb, 0.3-kb from the top. The arrow on the right indicates the 2.1 kb PCR product.

### 2. *A. japonica* Koidz ITS 1 DNA 염기서열의 계통학적 분석

삽주의 18S rRNA 유전자의 염기서열을 완전히 밝혔으나, 국화과 식물 중에서는 18S rRNA 유전자의 염기서열이 밝혀진 식물이 거의 없기 때문에 계통학적 비교분석을 위하여 ITS 1의 염기서열을 사용하였다. 그 결과, 삽주의 ITS 1 DNA sequence는 *Atractylodes*속의 다른 식물들인 *A. lancea*, *A. koreana*, *A. chinensis*, *A. macrocephala* 등의 ITS 1 DNA sequence와 높은 상동성을 나타내었다 (data not shown). 또한 삽주의 18S rRNA 유전자의 염기서열을 사용하여 BLAST 분석을 수행한 결과, 괴불나무 (*Lonicera maackii*), gerbera (*Gerbera jamsonii*), water marigold (*Megalodonta beckii*) 등과 높은 상동성을 보였다. 또한 본 연구에서 그 추출액을 HPLC로 분석한 삽주, 구절초, 인진쑥, 한련초, 민들레의 ITS 1 염기서열들을 서로 비교 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 구절초의 경우는 분석에 사용된 258개의 염기 중에서 179개의 염기가 삽주와 일치하였다. 즉, 구절초는 69.4%의 상동성 (homology)을 보이고 있었다. 또한 같은 방법으로 분석한 결과, 인진쑥은 68.6%의 상동성을 보였고, 한련초는 65.5%, 그리고 민들레는 62.7%의 상동성을 나타내었다. 같은 방법으로 분석한 결과, 산형과 또는 미나리과로 분류되는 당귀는

삼주의 18S rRNA 유전자의 염기서열 결정

```

          10          20          30          40          50          60
Czaw TCGAACCCCTGCAAAGCAGAACGACCCCGTGAACACGTAACAAACAACCGAGTGTGAGAGGA
Acap TCGAACCCCTGCAAAGCAGAACGACCCCGTGAACACGTAACAAACAACCGAGTGTGCGTTGGA
Ajap TCGAAGCCTGCACAGCAGAACGACCCCGCAACATGTAATGACAACCGGGCGTGGGGGGAA
Epro TCGAATCCTGCACAGCAGAACGACCTGTGAACATGTAA-AACAATCGGCTTCACCGGGAC
Tmon
TCGAACCCCTGCAAGGCAGAACGACCCCGTGAACACGTAATAACAACCTGGGTGATGGGGAGA
*****

          70          80          90          100         110         120
Czaw CCAAGCTCCTGTTTGATCCTCTCGACGCTTTGTCGATGCGCATTACTCGAGTCCTTTTG
Acap TCAAGCGCTTGTGATGCAATCGACGCTTTGTCGATGCGCATTCACTCGAGTCTGTCTG
Ajap
ACGGGCGCAAGCCCGGGACCTGCGGCGCTTCGTCGGCGAGCGTCCGTGGCATCCCTATCG
Epro TAAAGTTTTGCTTTGGTCTCGTGAAGCATTGTTGACGTGTTCATGTTCTGCCATTT
Tmon TGGATCTTGTTCTGATCCT--CAACACCTT-CTAGCGTGCCTGCATGCTTTCTCTTTG
*****

          130         140         150         160         170         180
Czaw GACC-TTGTGAATGTGTCATTGGCGCATTAAACAACCCCGGCACAACGTGTGCCAAGGAA
Acap GACCCTTGTGAATGTGTCATTGGCGCATTAAACAACCCCGGCACAATGTGTGCCAAGGAA
Ajap GGGCCTTGGCGGCGTTTCGTCGGCACATAAACAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAA
Epro AGGCGTCATGGATATCAAGTTGACAC--AACAACCCCGGCACGACATGTGCCAAGGAG
Tmon GGCTATCATGCATGTATTGTTGAATTTAACAAAACCCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAA
*****

          190         200         210         220         230         240
Czaw AACTAAACTCTAGAAGGCTTGT-TTCATGATGCCCCCGTTCGCGGTGTGCTCATGGGATG
Acap AACTAAACTCTAGAAGGCTCGTCTTTCATGTTGCCCCCGTTCGCGGTGTGCTCATGGGATG
Ajap AACAAAACCTAAGAAAGGCGCTTCTCGTGTGCGCCC-GTTCGCGGTGCGTGCATGGGTGCG
Epro AACTAAACTTAA-AGAGCTTGT-GTTATGACGCCCC-GTTTTGCGGTGCGCATTGCACA
Tmon AACAAATAACGAGAAGGACTCGACCTGTTATGCCCC-GTTTTGCGGTGCGCATTCTGAGCG
*****

          250         258
Czaw TGGCTTCTTTATAATCAC
Acap TGGCTTCTTTATAATCAC
Ajap TGGCCTCTCTGGAAACAC
Epro TGGCTTCTTTGTAACACT
Tmon TGTCCTCCTTTGAATCAC
*****

```

**Fig. 2.** Multiple alignment of the internal transcribed spacer 1 sequences of *Atracrylodes japonica* (accession number EU678363), *Chrysanthemum zawadskii* (accession number DQ028924), *Artemisia capillaris* (accession number AY548201), *Eclipta prostrata* (accession number EF190031) and *Taraxacum mongolicum* (accession number EF114672). The perfect matches are marked by asterisks. Abbreviations: Czaw for *Chrysanthemum zawadskii*, Acap for *Artemisia capillaris*, Epro for *Eclipta prostrata*, Ajap for *Atracrylodes japonica*, and Tmon for *Taraxacum mongolicum*.

45.7%의 상동성을 보였고, 현삼과에 속하는 지황은 51.3%의 상동성을 나타냈다. 따라서 이러한 결과를 가지고 판단하면 비교 대상인 다섯 가지의 국화과 식물들간의 상동성은 산형과나 현삼과 같은 다른 과의 식물들보다는 월등하게 높다는 것을 알 수 있다. 그러나 국화과에 속하는 다섯 가지 식물들 중에서는 구절초와 인진쑈는 비교적 삼주와 가까우나, 한련초와 민들레는 유연관계가 비교적 먼 것으로 나타났다.

Dong *et al.* (2003)은 널리 쓰이고 있는 한약재인 황기 (*Astragalus* species)의 5.8S rRNA spacer, ITS 및 18S rRNA 유전자의 염기서열을 완전히 밝혀내어 보고하였다. 또한 Zhao *et al.* (2003)은 中國當歸, 韓國當歸, 日本當歸의 5S rRNA의 spacer region의 염기서열을 완전히 밝혀내서 비교하였다. 한 편 국내에서는 Choi *et al.* (2004)이 위의 세 가지 當歸의 ITS region의 염기서열을 밝혀내어 서로 비교하였고,

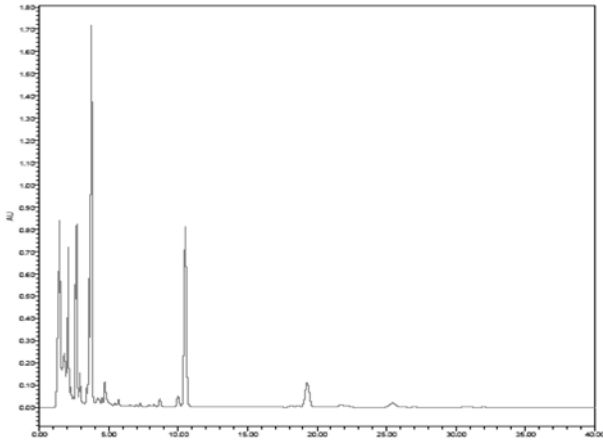


Fig. 3. HPLC profile of the methanol extract of the *Atractylodes japonica*. The scale of the vertical axis is from 0 to 1.80.

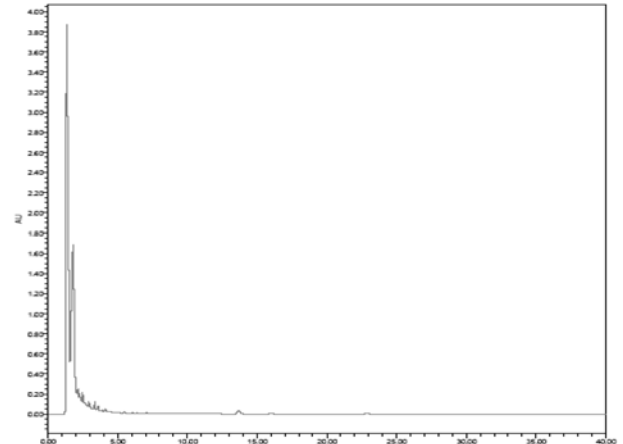


Fig. 5. HPLC profile of the methanol extract of the *Artemisia capillaris*. The scale on the vertical axis is from 0 to 4.00.

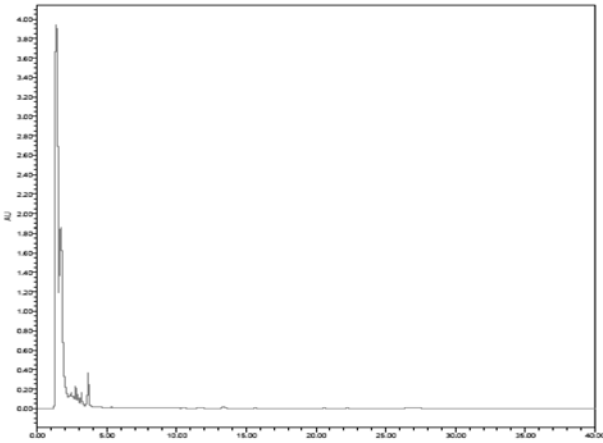


Fig. 4. HPLC profile of the methanol extract of the *Chrysanthemum zawadskii*. The scale on the vertical axis is from 0 to 4.00.

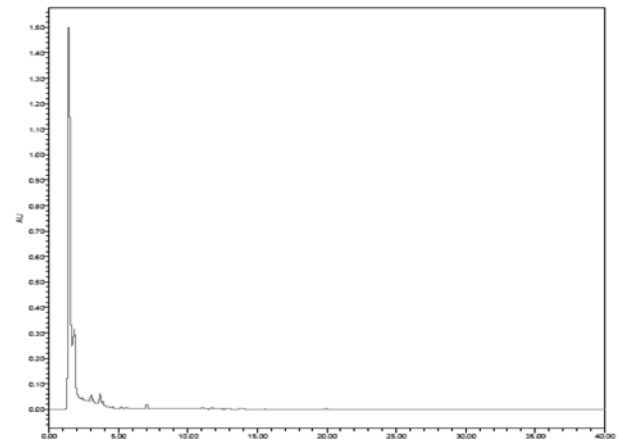


Fig. 6. HPLC profile of the methanol extract of the *Eclipta prostrata*. The scale on the vertical axis is from 0 to 1.50.

Kim *et al.* (2008)은 지모(*Anemarrhena asphodeloides*)의 엽록체 DNA의 염기서열을 분석하여 그 유연관계를 연구하였다. 또한 Shiba *et al.* (2006)은 삼주의 nrDNA의 ITS 염기서열을 밝혀내어 삼주의 여러 종간의 차이를 확인해 볼 수 있도록 하였다. 이러한 결과를 살펴보면 rRNA 유전자의 염기서열을 식물 종의 판별 또는 진화적 연관성을 연구하는 데에 많이 이용하고 있음을 알 수 있다. 국화과 식물들 중에서는 화기형태에 의한 한국산 자생종의 유연관계를 연구한 경우는 있었으나 (Sung *et al.*, 2008), 현재까지 삼주를 비롯한 국화과 식물들의 18S rRNA 유전자의 염기서열은 전혀 알려지지 않았고, phylogenetics를 연구할 때에 가장 많이 사용되는 염기서열이 원핵생물인 경우에는 16S rRNA, 진핵생물인 경우에는 18S rRNA임을 감안할 때에 삼주를 포함하는 국화과 약초들의 18S rRNA의 염기서열을 완전히 밝혀내는 것이 삼주 및 유사한 다른 식물들과의 진화적 연관성을 연구하고 또한 화학적 연관성

을 추정하는 데에 중요한 것임을 알 수 있다 (Olsen and Woese, 1993).

### 3. 국화과 식물 추출물의 HPLC 분석

본 연구에서는 삼주 이외의 다른 국화과 약초들인 구절초, 인진쑥, 민들레, 한련초의 추출물로부터 atractylon의 존재 여부를 추정하기 위하여 HPLC를 이용한 분석을 수행하였다 (Fig. 3, 4, 5, 6, 7). 그 결과 삼주의 추출물에서는 10.5분에 atractylon의 peak가 관찰이 되었으나, 그 외의 식물들로부터는 atractylon에 해당하는 두드러진 peak를 찾을 수가 없었다. 따라서 이들 식물들로는 한약재로서의 삼주를 대신할 수 없음을 알 수 있었다. 다만 phylogenetic analysis로부터 삼주와 유연관계가 가장 먼 것으로 나타난 민들레의 추출액에서 atractylon peak와 유사한 위치에서 미약한 peak가 관찰되었다 (Fig. 7). 만일 이 peak가 atractylon에 해당된다면, 이는

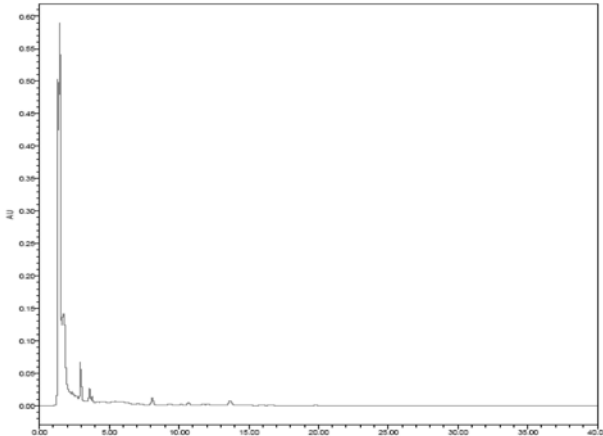


Fig. 7. HPLC profile of the methanol extract of the *Taraxacum platycarpum*. The scale on the vertical axis is from 0 to 0.60.

phylogenetic analysis가 chemical analysis와 서로 잘 일치하지 않는다는 것을 나타낸다고 볼 수 있다. 이 peak에 해당되는 물질을 분리 및 정제하여 그 구조를 화학적으로 분석한다면 더 명확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 현삼과 식물들의 경우에는 phylogenetic 분류 결과와 chemosystematic 분류 결과가 서로 잘 일치하지만, 이러한 결과들이 기존의 분류 결과와는 서로 일치하지 않는 점이 많음을 현삼과에 속하는 *Veronica*속 식물들을 분석함으로써 밝힌 보고가 있었다 (Taskova *et al.*, 2004). 따라서 국화과 식물들의 경우에는 좀 더 체계적인 연구가 필요하다고 본다.

백출이 함유하고 있는 다양한 물질들이 현재까지 보고되어 있고, 또한 백출의 효능은 이미 여러 논문에 의해 입증되어 있다. 따라서 백출의 원료인 삼주를 유전적, 화학적 그리고 임상적으로 더욱 깊이 연구할 가치는 충분하다고 판단된다. 그리고 삼주에 함유되어 있는 이러한 성분들 중에서 약효에 대한 연구가 가장 많이 되어있고, 또한 주된 역할을 하는 성분으로 추정되는 것이 atractylon이다. 본 연구에서 삼주 이외의 4종의 다른 국화과 식물들로부터 의미있는 양의 atractylon을 발견할 수 없었다. 그러나 이러한 물질이 삼주 이외의 다른 식물들에서도 발견될 가능성이 남아있다는 것을 감안할 때 phylogenetic analysis로 얻어진 결과를 참고하여 삼주와 진화적으로 가까운 식물들을 찾아내고, 그러한 식물들을 화학적으로 분석해 봄으로써 여러 가지 유용한 신물질의 발견, 또는 약용식물들의 품종개발에 기여할 수 있으리라 여겨진다.

### 감사의 말

본 연구는 한국학술진흥재단 기초연구과제 (과제번호: KRF-2006-311-E00571)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드

립니다.

### LITERATURE CITED

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.
- Bae YM, Bae RE and Shin DM. (2006). Determination of the DNA sequence of the 16S rRNA gene of the *Rehmania glutinosa* and its phylogenetic analysis. *Korean Journal of Herbology*. 21:9-13.
- Choi HY, Choi YJ, Lee JH and Ham I. (2004). Sequencing analysis on the ITS region and AFLP analysis to identify dried medicinal *Angelica* species. *Korean Journal of Herbology*. 19:91-99.
- Cline J, Braman JC and Hogrefe HH. (1996). PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*. 24:3546-3551.
- Dong TT, Ma XQ, Clarke C, Song ZH, Ji ZN, Lo CK and Tsim KW. (2003). Phylogeny of *Astragalus* in china: molecular evidence from the DNA sequences of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51:6709-6714.
- Han SB, Lee CW, Yoon YD, Lee JH, Kang JS, Lee KH, Yoon WK, Park SK and Kim HM. (2005). Prevention of arthritic inflammation using an oriental herbal combination BDX-1 isolated from *Achyranthes bidentata* and *Atractylodes japonica*. *Archives of Pharmaceutical Research*. 28:902-908.
- Heo J. (2005). Donggeuibogam. Yeogang Press. Seoul, Korea. p. 2959.
- Jang MH, Shin MC, Kim YJ, Kim CJ, Kim Y and Kim EH. (2004). *Atractylodes japonica* suppresses lipopolysaccharide-stimulated extractions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27:324-327.
- Kim MK, Jigden B, Hua S, Noh JH, Kim SY and Yang DC. (2008). Phylogenetic analysis of Ji-Mo (*Anemarrhena asphodeloides*) on the basis of chloroplast DNA sequences. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:20-26.
- Kiso Y, Tohkin M and Hikino H. (1985). Mechanism of antihepatotoxic activity of atractylon. *Plant Medicine*. 51:97-100.
- Kitajima J, Kamoshita A, Ishikawa T, Takano A, Fukuda T, Isoda S and Ida Y. (2003). Glycosides of *Atractylodes japonica*. *Chemical and Pharmacological Bulletin*. 51:152-157.
- Lee CB. (2003). Atlas of korean plants. Hyangmoon Press. Seoul, Korea. p. 271.
- Min BS, Kim YH, Tomiyama M, Nakamura N, Miyashiro H, Otake T and Hattori M. (2001). Inhibitory effects of korean plants on HIV-1 activities. *Phytotherapy Research*. 15:481-486.
- Olsen GJ and Woese CR. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB Journal*. 7:113-23.
- Park JH. (2004). Atlas of medicinal plants in korea. Shinil Press. Seoul, Korea. p. 1336-1337.
- Resch M, Heilmann J, Steigel A and Bauer R. (2001). Further phenols and polyacetylenes from the rhizomes of *Atractylodes lancea* and their anti-inflammatory activity. *Planta Medicine*.

- 67:437-442.
- Sakuri T, Yamada H, Saito K and Kano Y.** (1993). Enzyme inhibitory activities of acetylene and sesquiterpene compounds in *Atractylodes* rhizome. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 16:142-145.
- Satoh K, Nagai F, Ushiyama K and Kano I.** (1996). Specific inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by atractylon, a major component of byaku-jutsu, by interaction with enzyme in the E<sub>2</sub> state. *Biochemical Pharmacology*. 51:339-343.
- Shiba M, Kondo K, Miki E, Yamaji H, Morota T, Terabayashi S, Takeda S, Sasaki H, Miyamoto K and Aburado M.** (2006). Identification of medicinal *Atractylodes* based on ITS sequences of nrDNA. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29:315-320.
- Sin KS, Kim HP, Lee WC and Pachaly P.** (1989). Pharmacological activities of the constituents of *Atractylodes* rhizomes. *Archives of Pharmaceutical Research*. 12:236-238.
- Sung JS, Lee JH, Lee JW, Bang KH, Yeo JH, Park CG, Park HK, Seong NS and Moon SG.** (2008). Phylogenetic analysis of *Artemisia* spp. by morphological characteristics of reproductive organs in Korea. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:218224.
- Taskova RM, Albach DC and Grayer RJ.** (2004). Phylogeny of *Veronica* - a combination of molecular and chemical evidence. *Plant Biology*. 6:673-682.
- Wada H and Satoh N.** (1994). Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rRNA. *Proceedings of National Academy of Sciences in USA*. 91:1801-1804.
- Wang KT, Chen LG, Yang LL, Ke WM, Chang HC and Wang CC.** (2007). Analysis of the sesquiterpenoids in processed *atractylodis* rhizoma. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 55:50-56.
- Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, Yang HC and Yamada H.** (1998). Intestinal immune system modulating polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea*. *Planta Medicine*. 64:714-719.
- Zhao KJ, Dong TT, Tu PF, Song ZH, Lo CK and Tsim KW.** (2003). Molecular genetic and chemical assessment of radix *Angelica* (danggui) in China. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51:2576-2583.