

최 종  
연구보고서

# 당단백질의 3차구조적 분석을 이용한 고유 농산물의 고품질화 기술개발

Studies on the development of a high-quality agricultural product using 3-dimensional structural analyses of glycoproteins

1999-169

연구기관	농림부 자료실
고려대학교	등록번호: 1128
	등록일: 2001년 12월 18일
	서명:

농림부

# 최 종 보 고 서

190mm × 268mm

1996 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 당단백질의 3차구조적 분석을 이용한 고유 농산물의 고품질화 기술개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1매

1999. 10. 19.

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 김 경 현 (인)

주관연구기관장 : 총 장 직인

농림부장관 귀하



## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “당단백질의 3차구조적 분석을 이용한 고유 농산물의 고품질화 기술개발” 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 19.

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 김 경 현

연 구 원 : 김 유 경

연 구 원 : 우 정 숙

연 구 원 : ○ ○ ○

협동연구기관명 : ○ ○ ○

협동연구책임자 : ○ ○ ○

협동연구기관명 : ○ ○ ○

협동연구책임자 : ○ ○ ○

# 요 약 문

## I. 제 목

당단백질의 3차구조적 분석을 이용한 고유 농산물의 고품질화 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

고유 식물자원을 이용한 신소재 및 생리활성물질을 생산하려는 기술개발이 많이 시도되고 있다. 전세계적으로 수많은 천연물에 대해서 이미 데이터베이스가 확립되어 있고, 약효성분을 얻을 수 있는 재료확보가 어렵기 때문에 극한 조건에서 생존하는 미생물(extremophiles)에 이르기까지 신소재의 개발영역은 무한경쟁에 들어서 있다. 우리나라가 보유하고 있는 고유식물자원 중에서 인삼은 세계에 내놓을 수 있는 경쟁력있는 품목임에도 연구는 사포닌 화합물을 중심으로 수십년간 이루어져 왔기 때문에, 생화학적으로 중요한 다른 인삼생체물질에 대한 연구는 기초단계를 벗어나지 못하고 있다. 미래 생명공학적 산업구조의 대열에 설 수 있는 고유자원을 단백질 및 탄수화물 공학기술로 개발하여 세계 경쟁력을 확보함으로써 우리고유의 신소재를 발굴해내는 일은 중요하다.

당펩타이드의 구조적 분석을 이용함으로써 고부가가치 신소재를 탐색 및 동정하기 위하여 2가지 주된목표를 갖고 연구를 수행하였다. 첫째는 생리활성을 보유한 당펩타이드성 화합물 및 wound healing에 관계된 활성을 보유한 당단백질의 특성을 기초로한 물질의 개발이며, 둘째는 단백질과 상호작용하는 탄수화물의 분리, 특성 및 새로운 활성의 탐색 및 제품화 기술개발이었다. 분리된 다당류 분획은 *Helicobacter pylori*의 hemagglutination을 저해한다는 중요한 연구결과를 얻게 되었다. 특히 기존에 개발된 다당류의 hemagglutination 저해가 mg/ml 단위의 높은 농도를 필요로 하는데 비하여, 분리된 다당류는 3-5배 낮은 농도에서 저해활성을 보여주었다.

국내외 기술동향과 수준에 비추어 당펩타이드, 당단백질 및 탄수화물 다당류에 대한 주요 생리활성을 보유한 신소재 개발은 세계적 경쟁력을 갖고있으며 고려인삼 생체물질 중에서도 아직 미답의 상태에 있는 이들 신소재의 잠재력은 크다고 판단된다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

- 고려수삼 및 가공홍삼 단백질의 패턴 분석
- 당단백질 및 당펩타이드의 고순도 분리, 정제기술 확립
- 펩타이드 mapping을 통한 활성 당펩타이드 성분 동정
- 분리 정제된 당단백질과 당펩타이드의 탄수화물 분석
- 약리효능 및 생리활성 측정법 개발
- 활성 펩타이드 및 탄수화물의 구조적 분석
- 천연신소재 개발을 위한 당펩타이드의 디자인

### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

없음

# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. Title

Studies on the development of a high-quality agricultural product using 3-dimensional structural analyses of glycoproteins

### II. Specific aim and significance

Much effort has been concentrated on searching for new biomaterials. Since many worldwide databases for natural products were already established, it becomes more and more difficult to obtain a new physiologically active material and is very competitive such that searching efforts now extends to extremophiles. Among many natural resources in our country, ginseng is widely known as one of the most competitive biotechnological product. However, the research subject in ginseng plants has been narrowed down to saponins for the past decades so that the research on other materials in ginseng has been limited. Protein and carbohydrate engineering techniques in life sciences are valuable tools for developing new biomaterials from our original resources.

We have worked on glycopeptides using structural methods with two research targets, in order to search for and to identify high-quality new biomaterials. First, it was to obtain a glycopeptide with a physiological activity and a glycoprotein with a wound-healing activity. Second, it was about carbohydrates which interact with a protein and whose purification, identification, and whose function has been investigated. In particular, the acidic polysaccharide fraction isolated from ginseng showed an anti-adhesive activity against *Helicobacter pylori*-induced hemagglutination. Its activity was higher than that of conventional carbohydrate candidates, much less than the concentration of mg/ml.

From the past experience and information, search for new biomaterials from ginseng would be successful and competitive in world markets. Those materials such as glycopeptides and carbohydrates from ginseng may have a tremendous effect on biotechnological markets.

### III. Experimental Design

- Protein pattern analysis of red and white ginseng
- Establishment of purification techniques for glycoprotein and glycopeptides
- Identification of glycopeptides using peptide mapping
- Carbohydrate analysis of purified glycoproteins and glycopeptides
- Establishment of physiological and pharmaceutical activity techniques
- Structural studies of physiologically active peptides and carbohydrates
- Design of glycopeptides for developing a natural biomaterial

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

- Chapter 1 Introduction
  - Section 1 Specific Aim
  - Section 2 Experimental Design
  
- Chapter 2 Main Subject
  - Section 1 Yearly Specific Aim
  - Section 2 Methods and Results
    - (1) The First year Period
    - (2) The Second Year Period
    - (3) The Third Year Period
  
- Chapter 3 Conclusion
  - Section 1 Results and Discussion
  - Section 2 Application
  
- Chapter 4 References



# 목 차

## 제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적

제2절 연구개발 범위

## 제 2 장 본 론

제1절 연차별 연구개발목표 및 내용

제2절 연구방법 및 결과

제1항 1차년도

제2항 2차년도

제3항 3차년도

## 제 3 장 결 론

제1절 연구결과 및 논의

제2절 연구결과의 활용

## 제 4 장 참고문헌

# 본 문

## 제 1 장 서 론

### 제1절 연구개발의 목적

고려인삼 연구는 화학적 구성성분의 정성적인 그리고 단순한 정량적인 차이로만 밝혀왔던 이화학적 분석 연구로부터, 최근 사포닌을 중심으로 하여 순수분리 및 합성을 통한 화학적 구조분석, 생리활성 측정으로 이어지는 생화학, 생리학적인 연구로 발전하고 있다. 현재까지 사포닌과 당을 비롯한 몇몇 화합물을 제외하고는 crude한 분획을 이용하여 기초 및 임상실험을 통해 고려인삼의 효능을 증명하는 연구로 일관되어 왔다. 이는 생리물질의 순수분리와 동정 그리고 구조분석 연구의 첨단과학적 뒷받침이 제한적일 수 밖에 없었던 이유때문이라 사료된다. 인삼에서 추출된 효소, 단백질 및 펩타이드를 순수분리하여 생화학적 특성 및 활성을 밝히고 구조적 분석 내지는 규명을 이루려는 단백질 및 탄수화물 공학적 연구는 국내에서 아직 시도되지 않고 있다. 당과의 복합체를 이루는 단백질의 경우 탄수화물에 대한 분석기술이 최근에 급속히 발전되고 있어 식품 및 제약산업에서 이미 개발 성숙단계에 와있는 상태이지만, 앞으로 보편화될 이러한 첨단기술이 적용되어야 할 인삼가공 분야에 있어서는 아직 초보단계에 있다.

고려인삼은 오가과(Araliaceae) 인삼속(panax)에 속하는 반음지성 속근초로서 *Panax ginseng* C. A. Meyer로 명명된다. 미국에서 재배되고 있는 인삼은 *Panax quinquefolium* L.로서 형태적으로는 고려인삼과 유사하나 약효에 있어서 뚜렷한 차이를 보이고 있다. 우리고유의 오랜전통을 갖는 고려인삼은 현재 우리나라에서 농수산물 단일작목으로는 수출 제 1위의 상품으로(1) WTO에 대응할 가장 유망한 수출품의 하나라고 할 수 있다. 특히 고려홍삼은 홍삼 1 등품의 수출가격이 그램당 2 달러로서 최첨단 상품인 전자 chip에 버금가는 부가가치를 갖고있다. 고려인삼과 미국삼의 생화학적 성분 함량을 비교해 보면 단백질, 조섬유, 및 당질의 함량이 고려인삼이 월등히 높고, 지방질 성분과 아미노산의 함량에 있어서도 다소 높은 것으로 나타나 있다(2). 최근 저가와 대량물량 공세를 해오고 있는 외국삼의 거센 도전에 직면하고 있는 상황에서, 고려인삼의 제품의 품질을 높이고 우수성을 과학적으로 증명하는 일은 시급하다. 당단백질 및 당펩타이드를 이용하는 첨단 생물공학적 연구는 상대적으로 미진한 단백질연구를 활성화시킬 뿐만 아니라 생리활성의 탐색연구에 새로운 장을 여는 결과를 가져올 수 있다. 본 연구에서는 당단백질 및 당펩타이드의 생화학적 및 생물리학적 연구, 특히 인삼뿌리에서 당단백질, 펩타이드 및 탄수화물을 탐색하기 위하여, 고려인

삼과 외국삼에서의 단백질의 패턴비교를 통해 두 인삼간의 차이를 보이는 단백질을 1차 대상으로 연구를 수행하고자 한다. 비교 분석을 통해서 특이 단백질 및 펩타이드의 동정이 비교적 수월하게 되며, 특이 단백질의 탄수화물과의 결합체(Complex) 형성을 규명하고자 최근 기술축적이 활발하게 이루어지고 있는 당단백질(Glycoproteins) 연구를 수행함으로써 탄수화물 및 단백질의 분석이 가능하도록 한다. 궁극적으로 고려인삼에 있어서 약리효능 및 생리활성 물질을 분자수준에서 구조적 연구를 바탕으로 규명하고자 한다.

## 제2절 연구개발 범위

- 고려수삼 및 가공홍삼 단백질의 패턴 분석
- 당단백질 분석을 위한 기술체계 확립
- 당단백질 및 당펩타이드의 고순도 분리, 정제기술 확립
- 펩타이드 mapping을 통한 활성 당펩타이드 성분 동정
- 분리 정제된 당단백질과 당펩타이드의 탄수화물 분석
- 약리효능 및 생리활성 측정법 개발
- 활성 펩타이드 및 탄수화물의 구조적 분석
- 천연신소재 개발을 위한 당펩타이드의 디자인

## 제 2 장 본 론

### 제1절 연차별 연구개발목표 및 내용

	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1 차 년 도	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 고려인삼과 외국삼과의 단백질 패턴 비교</li> <li>2. 홍삼에서의 내백과 정상 부위의 단백질 및 펩타이드 패턴 비교</li> <li>3. 단백질 패턴 차이를 보이는 특정 당단백질 및 당펩타이드의 분리와 정제</li> <li>4. 생리활성 측정을 위한 방법 및 조건 탐색</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 인삼에서의 당단백질 및 당펩타이드 추출 방법 및 조건의 확립</li> <li>2) 고려인삼과 미국삼에서의 단백질 및 펩타이드 패턴의 비교 분석 - 1차 및 2차 전기영동</li> <li>3) 두 삼에서의 차이를 보이는 생체고분자 당단백질 및 당펩타이드의 분리 정제</li> <li>4) 순수 분리된 특이 당단백질의 펩타이드 mapping 조건 및 생리적 활성 측정을 위한 방법 모색</li> <li>5) Mapping을 위한 화학적, 효소적 조건 확립</li> </ol>
2 차 년 도	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 당단백질 및 펩타이드의 분리 정제</li> <li>2. 펩타이드 mapping</li> <li>3. 당단백질의 탄수화물 특성 조사</li> <li>4. 생리활성 조사</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 인삼에서의 당단백질 및 당펩타이드의 분리와 정제를 계속하고 순수 분리된 특이 당단백질과 당펩타이드의 생리적 활성 측정</li> <li>2) 특정 당단백질의 펩타이드 mapping - 2차 전기영동 이용</li> <li>3) Mapping 동정된 당펩타이드의 분리정제</li> <li>4) 당단백질의 탄수화물(올리고당) 분석</li> <li>5) 주요 생체효소 활성에 대한 영향을 밝히고 항산화성과 같은 생리활성 측정</li> </ol>
3 차 년 도	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 당펩타이드의 대량생산 체계 확립조건</li> <li>2. 펩타이드, 당 sequencing</li> <li>3. 당펩타이드 구조분석</li> <li>4. 제품개발을 위한 기술 탐색</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 분리 정제된 당펩타이드의 구조분석을 위한 대량생산 체계 확립 조건 탐색 - N terminal sequencing - 펩타이드 및 당 합성</li> <li>2) 펩타이드 및 당 sequencing</li> <li>3) 펩타이드 및 당 구조분석</li> <li>4) 제품개발을 위한 당펩타이드 디자인 - 모델링 및 최소에너지 계산</li> </ol>

## 제2절 연구방법 및 결과

### 제1항 1차년도

#### 연구 개발 내용

- 1) 인삼에서의 당단백질 및 당펩타이드 추출 방법 및 조건의 확립
- 2) 고려인삼과 미국삼에서의 단백질 및 펩타이드 패턴의 비교 분석  
- 1차 및 2차 전기영동
- 3) 두 삼에서의 차이를 보이는 생체고분자 당단백질 및 당펩타이드의 분리 정제  
- chromatography 이용
- 4) 순수 분리된 특이 당단백질의 펩타이드 mapping 및 생리적 활성 측정을 위한 방법 모색
- 5) Mapping을 위한 화학적 및 효소적 조건을 확립

#### 연구방법

- 1) 인삼에서의 당단백질 및 당펩타이드 추출 방법 및 조건의 확립

정상수삼 6 년근의 주피부분을 오려낸 뒤 중심부분을 약 1 cm 입방면체의 크기로 잘게 썰은 다음, 100g의 인삼 뿌리부분을 완충용액과 함께 분쇄하였다. 분쇄한 homogenate를 cheese cloth를 이용하여 여과한 뒤 25,000g에서 약 40 분간 원심분리하여 그 상등액을 펩타이드 및 단백질 분리에 사용하였다. 상등액에 ammonium sulfate를 가하여 농도 25% (w/v)가 되도록 한 다음, 25,000g에서 15 분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액에 최종 ammonium sulfate 농도가 80% (w/v)가 되도록 ammonium sulfate를 천천히 가한 다음 약 1 시간정도 평형을 이루도록 하였다. 위와 같은 조건에서 다시 원심분리 하였고 이번에는 pellet을 완충용액을 이용하여 최소 부피에 용해시켜 하루동안 투석한 다음, microfiber filter로 여과한 용액을 다음 단계에 이용하였다. 올리고당 측정법으로는 Thymol-sulfuric acid staining을 이용하는 방법을 이용하여 당 측정을 하였다.

- 2) 고려인삼과 미국삼에서의 단백질 및 펩타이드 패턴의 비교 분석

고려인삼 및 미국삼 수삼뿌리로부터 추출한 시료 단백질들의 분리정도와 순도를 Laemmli 방법에 따라 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 측정하였으며(3), 10% 혹은 12% polyacrylamide gel을 실온에서 수행하였고, staining은 Coomassie brilliant blue R-250을 이

용하였다. 2차 전기영동의 경우는(4) 1차를 isoelectric focusing을 수행하고, 2차는 8-18% polyacrylamide gradient gel을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다.

3) 두 삼에서의 차이를 보이는 생체고분자 당단백질 및 당펩타이드의 분리 정제  
고려인삼에서 추출된 25k 주요 단백질은 미국삼의 주요 단백질과 생물리학적 차이를 보였으며(5), 순수분리를 위해서 Bio-gel P-100을 이용하여 size별로 단백질을 분획하였다. 이 때 유출되는 속도는 peristaltic pump를 이용하여 50 ml/hr로 하였고 분획된 부분중 280nm를 흡수하는 부분만을 모아 농축시킨 다음, DEAE Sepharose CL-4B를 이용한 ion exchange chromatography를 0-1M NaCl gradient를 이용하여 단백질을 분획하였다. 25kDa 단백질의 분리가 용이하지 않아 HPLC 용 reversed phase 및 ion exchange prepaced column을 각각 이용하였으며 최종단계인 ion exchange HPLC를 통과한 분획을 연구에 이용하였다.

4) 순수 분리된 특이 당단백질의 펩타이드 mapping 조건 및 생리적 활성 측정을 위한 방법 모색

① Mapping을 위한 화학적 및 효소적 조건 확립

화학적 조건으로 잘 이용되는 CNBr이 국내 수입이 어려움에 따라 단백질에 대한 특이성이 월등한 효소적 방법을 수행하기로 하였다. 여러 protease를 이용하여 최적 온도에서 단백질이 denature된 상태와 native한 상태에서 각각 proteolysis가 일어나는 조건을 확립하였다. 현재 인삼뿌리에서 추출된 단백질의 경우, 특히 당단백질로 보이는 major 단백질은 protease에 대해 매우 resistant하기 때문에 denature된 상태로 가수분해 조건을 확립하였으며(6), chymotrypsin, trypsin, protease X등과 같은 여러 가수분해 효소를 이용하였다.

② 생리적 활성측정 방법 모색

In vitro 항암성(7, 8), 항보혈성 방법(9) 및 항산화성 방법(10)을 탐색하였으며, 이 중에서도 In vitro 항암성 및 항보혈성에 대한 인삼 추출물 생리활성의 가능성을 보여주었다. 항보혈성은 외부실험으로 이루졌으며, in vitro 항암성은 본 연구실에 조건 확립을 완료하였다. 항암성은 두 가지 drug screening assay 방법을 이용하였으며, supercoiled DNA가 topoisomerase에 의하여 절단되는 양상이 single strand인지 double strand인지에 따라 topo I 혹은 II로 사용하여 효소에 대한 저해정도에 따라 항암성 여부를 결정하였다.

5) 홍삼에서 펩타이드의 분리 및 정제

홍삼뿌리를 완충용액으로 약 1-2시간동안 shaking 시킨 다음 갈아서 추출한 용액을 vacuum filtration으로 회수하였다. Ammonia sulfate fractionation (30-80%) 된 pellet을 최소부피에 용해시켜, Biogel P-6 column으로 280nm와 215nm의 두 파장에서 분획하였다. 높은 흡광도를 보이는 분획을 pooling 시켜

세 그룹으로 나눈 다음 superdex peptide HPLC prepacked column으로 흡광도 226nm 에서 분획하였다.

## 연구결과

1차년도와 2차년도의 주요단백질 GMP25의 분리정제 결과는 여러 chromatography 방법을 이용하였음에도 불구하고 GMP 단백질 밴드보다 약간 더 큰 분자량의 단백질 밴드를 제거하기가 어려웠다. 이는 2차년도에서 얻은 분리정제 방법으로 순수분리가 성공적으로 이루어지기 때문에 분리정제와 관련된 크로마토그래피 결과는 생략하였다.

고려인삼과 미국삼 6년근의 중심부를 잘게 썰어 균질화한 다음, ammonium sulfate fractionation을 이용하여 단백질 부분을 침전시켰다. 침전물을 용해, 투석을 수행하고, 농축하여 얻은 용액을 crude 단백질의 시료로 사용하였다. 고려인삼과 미국삼 공통적으로 5 가지의 단백질 밴드가 관찰되었으며, 단백질 분자량은 대략 20,000에서 66,000 사이의 분포를 보여주었다 (Fig. 1). 특히 이들을 native gel electrophoresis를 한 결과가 Fig. 2에 나타나있다. 결국 인삼의 주요단백질 (이하 GMP)은 subunit 25 kDa의 크기를 갖으며 2개이상의 subunit으로 된 oligomer임을 밝힐 수 있었다.

고려인삼의 주요 단백질로 보이는 66kDa 단백질을 분리 정제하기 위하여 Bio-gel P-100을 이용한 gel filtration chromatography를 수행하였다. Void volume 이후부터 유출되는 분획은 280 nm에서의 높은 absorbance를 보이는 커다란 peak와, elution 거의 마지막 단계에서 낮은 absorbance를 보이는 작은 peak

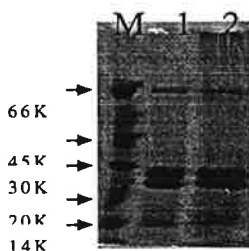


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of the crude protein extract from ginseng roots. Lane M: Molecular weight marker; Lane 1 : *Panax ginseng* crude extract; lane 2: *Panax quinquefolium* crude extract.

의 두 가지 peak로 구분되었다. 각 peak에서의 fraction을 일정하게 선택한 뒤 Amicon membrane을 이용 농축하여 전기영동을 수행하였으나, gel filtration column 유출 시간에 관계없이 크기별로 분획된 단백질들의 전기영동 패턴은 차이가 없음이 발견되었다. 고려인삼과 미국삼에서 추출한 단백질을 IEF 후에 2차 전기영동을 실시한 결과가 Fig. 3에 나타나 있다. 두 삼에 있어서 SDS-PAGE에서는 동일한 크기를 갖는 밴드들이 다양한 pI 값을 갖는 단백질임이 증명되었고, isoelectric focusing에서는 확연하게 구분할 수 없었던 고려인삼과 미국삼의 차이가 2차 전기영동을 한 결과 다양한 pI 값들에서 그 차이점들이 발견되었다. 29 kDa과 20 kDa 사이에서 고려인삼의 경우 약 세 개의 pI 값들에서 단백질이 발견 되었으며, 미국삼의 경우 약 네 개의 pI 값에서 단백질이 발견되었고 미국삼이 pH 7에서 고려인삼에서 발견되지 않는 단백질을 관찰하였다. 20 kDa이하에서도 두 삼간의 차이를 보이는 단백질들이 존재하는 것으로 나타났고 하나의 동일한 단백질이 관찰하였다. 결과적으로 29 kDa과 20 kDa 사이에서는 미국삼이 pH 7에서 발견되는 단백질이 고려인삼과 큰 차이점으로 생각이 되고 20 kDa이하에서는 고려인삼의 pH 7 쪽에서 발견되는 단백질이 미국삼과 비교해 볼 때 농도나 크기에 있어서 다른 점으로 판단되었다.

Major peak 분획을 pooling하여 DEAE Sepharose CL-4B를 이용한 ion exchange chromatography를 수행하여 얻었다. SDS-PAGE 결과 세 개의 peak중 가

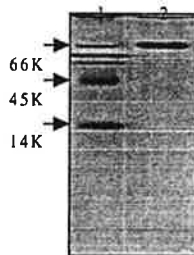


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis under nondenatured condition. Lane 1 : molecular weight markers; Lane 2 : *Panax ginseng* proteins.

운데 peak가 단백질을 대부분 함유하고 있음이 발견되었다. 특히 SDS-PAGE 상에서 25kDa major protein 외에 다른 단백질들이 gel filtration 및 ion exchange chromatography를 수행하였음에도 불구하고 분리되지 않았기 때문에, FPLC를 이용하게 되었다. Reversed-phase와 ion exchange FPLC를 수행한 elution profile



과 native gel electrophoresis를 통해 순수분리에 효과적이었음이 확인되었다.

당분석을 위한 thymol-sulfuric acid staining을 이용하는 방법을 통해 주요 단백질이 당을 포함한 complex 임이 확인되었고, 발색의 정도를 보존하는데 어려움을 갖고 있는 것 외에는 간단히 측정할 수 있는 방법으로 확인되었다. Fluorophore-assisted-carbohydrate- electrophoresis를 이용하여 정확한 올리고당의 함유와 서열까지 확인하는 실험을 위한 조건을 확립하는데는 측정효소의 활성유지가 어려운 것으로 판단되었다. 즉, fresh한 효소를 사용하는 것이 중요한 것으로 보인다.

최종 ion exchange FPLC로 부터 얻은 25kDa major protein에 대하여 가수분해 실험을 수행한 결과 protease에 대하여 매우 강한 저항성을 보이고 있기 때문에 가수분해 조건의 확립이 쉽지 않았다. 따라서 특이 단백질을 denatured 시킨 상태에서 가수분해를 수행하여 mapping에 필요한 효소적 조건을 확립하였다. Chymotrypsin이나 trypsin과 같은 가수분해 효소에 저항성을 갖고 있지만 protease X에 대해서 mapping에 필요한 조건을 충족시키는 것으로 확인되었다.

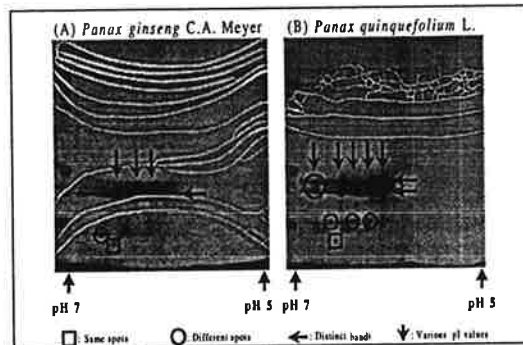


Fig. 3. Two dimensional electrophoresis protein patterns.

Left : *Panax ginseng*; Right : *Panax quinquefolium*.

홍삼의 경우 펩타이드의 분리는 Biogel P-6 column 통과후 superdex peptide FPLC column을 이용하였으며 분리능이 탁월하였다. 특히 정상뿌리와 내백뿌리로 부터 서로의 FPLC elution profile을 비교 분석함으로써 특이 분획을 발견할 수 있었으며(Fig. 4), 이에 따른 생리활성 측정을 수행하였다. 특히 Fig 4에 나타나는 3번 분획은 정상과 내백사이에 재현성있게 차이를 보이는 분획이었다.

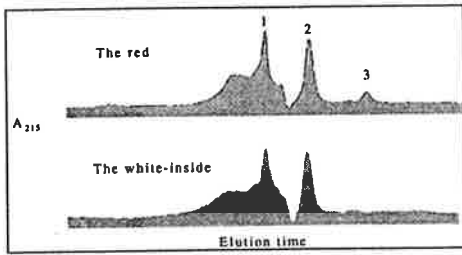


Fig. 4. Gel filtration FPLC elution profile. Left : normal root proteins; Right : "white inside" proteins.

## 제2항 2차년도 연구 개발 내용

- 1) 인삼에서의 당단백질 및 당펩타이드의 분리와 정제를 계속하고 순수 분리된 특이 당단백질과 당펩타이드의 생리적 활성측정
- 2) 특정 당단백질의 펩타이드 mapping
  - 2차 전기영동 이용
- 3) Mapping 동정된 당펩타이드의 분리정제
- 4) 당단백질의 탄수화물(올리고당) 분석
- 5) 주요 생체효소 활성에 대한 영향을 밝히고 항산화성과 같은 생리활성 측정

## 연구방법

### 1) 수삼에서의 당단백질 분리정제

시료 100g에서 단백질 용출은 280 nm에서의 흡수도로 측정하였고, 각 단계별 단백질의 순도는 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 분쇄한 homogenate를 cheese cloth로 1차 여과하고 10,000g에서 30 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 단백질 분리에 사용하였다. 이 상등액을 ammonium sulfate 25-80% 포화 농도에서 분리한 다음, 원심분리에 의해 침전된 단백질을 1 ml buffer A에 용해시키고 투석을 하여 탈염하였다. 이 농축액을 microfiber filter로 여과한 후 Sephacryl S-100 column (3×33cm)으로 분리하였고, Resource Q FPLC와 0-1M NaCl 직선 농도구배를 사용하여 다시 분리하였다. GMP 분획을 다시 Pharmacia Mono P column을 이용하여 pH gradient(pH7-5)로 GMP를 분획하였다. 최종적으로 순수분리된 GMP를 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 용액을 사용하여 투석한 다음, resource Q(1 ml)와 NaCl gradient를 이용하여 분리하였다.

2) 당단백질의 펩타이드 mapping을 이용하여 특정 당단백질의 펩타이드 fragment의 동정.

2-Dimensional Gel Electrophoresis을 이용하는 Dunbar의 방법을 변형한 것으로 1차원의 전하에 의한 분리를 다시 2차원의 SDS-PAGE를 이용해서 단백질의 크기에 따라 분리하며, staining은 silver staining 및 Coomassie Blue staining을 이용하였다.

### 3) 분리된 당단백질 및 당펩타이드의 당분석 및 당의 특성 및 서열 조사

Bio-Rad의 Enzymatic Deglycosylation Kit Instruction Manual (Catalog Number 170-6500)에 기술된 바와 같이 분리된 고려인삼의 major protein 용액

12  $\mu$ l에 4  $\mu$ l 5 $\times$ reaction buffer 를 가하여 반응 용액을 준비하였다. 반응 용액에 2  $\mu$ l NANase II, 2  $\mu$ l O-Glycosidase를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 10  $\mu$ l 증류수, 10  $\mu$ l pH adjustment buffer, 2.5  $\mu$ l denaturing buffer를 가한 다음, 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 증탕하였다. 이 반응 용액을 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 cooling하고, 2.5  $\mu$ l NP-40, 2  $\mu$ l PNGase F를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 12% SDS-PAGE를 수행한 다음 Coomassie blue로 염색하여 단백질 밴드의 이동정도를 확인하였다.

#### 4) 홍삼에서 펩타이드의 분리 및 정제

홍삼뿌리를 완충용액으로 약 1-2시간동안 shaking 및 incubation 시킨 다음, 약 1 cm 입방면체의 크기로 잘게 썰은 다음, 100 g의 인삼 뿌리부분을 완충용액과 함께 분쇄하였다. 분쇄한 homogenate를 cheese cloth로 여과하거나 vacuum filtration으로 회수하였다. 이를 15,000 x g에서 약 40 분간 원심분리하여 그 상등액을 펩타이드 및 단백질 분리에 사용하였다. 상등액에 ammonium sulfate를 가하여 농도 35-80% (w/v)되는 분획만 최소 부피에 용해시켜 Biogel P-6 column으로 280nm와 226nm의 두 파장에서 분획하였다. 높은 흡광도를 보이는 분획을 pooling 시켜 세 그룹으로 나눈 다음 superdex peptide FPLC prepaced column으로 흡광도 226nm에서 분획하였다. 이들 분획을 pooling하여 FPLC RPC (reversed phase chromatography)를 이용하여 다시 분리하였다.

#### 5) 분리된 특이 당단백질 및 당펩타이드 생리적 활성 측정

##### ① 항산화성 측정(11)

In vitro 항암성, 항보혈성 및 항산화성 방법을 탐색하였으며, 이 중에서도 항산화성은 소뇌를 이용하였다. 소뇌를 fresh하게 얻어(도살후 1시간이내) 혈관 및 뇌막을 제거하고 cold room에서 teflon homogenizer를 이용하여 phosphate saline 완충용액(40 mM phosphate pH 7.4, 0.142 M NaCl)으로 약 2분간 분쇄하였다. 1,000 x g에서 15 분간 원심분리후 상층액을 -70  $^{\circ}$ C에 보관하여 소뇌 추출물로 사용하였다. 보관된 소뇌 homogenate를 phosphate 완충용액에 단백질 1 mg/ml의 농도로 희석한 뒤, 홍삼에서 추출한 펩타이드 분획 sample을 37  $^{\circ}$ C에서 1시간동안 incubation 한 다음, 28% TCA 용액 1.25 ml를 가하였다. 혼합용액을 3,000 x g에서 10분간 원심분리하고 2 ml 상층액에 1% TBA 용액 0.5 ml를 가하고 15 분간 끓였다. 532 nm에서의 흡광도를 측정한 후, 아래 식에 따라 항산화성 정도를 계산하였다. Control은 홍삼추출물을 넣지 않았을 때 반응후 소뇌 추출물의 흡광도를 의미한다.

$$\text{항산화성(\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Abs(test)} - \text{Abs(0 time)}}{\text{Abs(control)} - \text{Abs(0 time)}} \right] \times 100$$

## ② 항보혈성 측정

적혈구 또는 토끼 적혈구 희석액 40  $\mu\text{l}$ 에 160  $\mu\text{l}$ 의 증류수를 가하여 완전히 용혈되게 한 후, 0-100%로 희석하여 405 nm 또는 540 nm에서 적혈구 용혈액 농도와 흡광도 상관관계를 조사하였다. 이를 기준으로 보체 결합반응을 3회반복으로 진행하여 측정된 용혈 흡광도를 용혈정도로 환산하여 각 실험구의 용혈율(% hemolysis)을 계산하였다. 항보혈성 측정은 생명공학연구소에 의뢰하여 수행하였다.

## ③ Topoisomerase I drug screening assay(12)

Supercoiled DNA (250 mg/ml) 1  $\mu\text{l}$ , 5 $\times$ topoisomerase I assay buffer 2.5  $\mu\text{l}$ 를 함께 넣고, 이 반응용액에 camptothecin (topoisomerase I inhibitor)을 최종농도 200  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 2 mM, 10 mM로 각각 가한 다음 각 반응용액의 부피를 증류수로 9  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. Topoisomerase I (2 units/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 를 가하여 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분간 반응시킨 후, 10% SDS 1  $\mu\text{l}$ 를 가하여 반응을 정지시켰다. Proteinase K를 반응용액의 최종 농도가 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 넣고 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분간 반응시킨 후, 반응 용액과 같은 양의 CIA (chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1) 용액을 가하고 vortex와 원심분리를 하였다. 상층액을 취한 후에 gel loading dye를 가하고 1% native agarose gel 전기영동을 하여 EtBr로 염색하였다. 이 때 고려인삼으로부터 분리한 GMP (3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; MW, 25 kDa) 1  $\mu\text{l}$  (12  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$  (24  $\mu\text{M}$ ), 3  $\mu\text{l}$  (36  $\mu\text{M}$ ), 4  $\mu\text{l}$  (48  $\mu\text{M}$ ), 5  $\mu\text{l}$  (60  $\mu\text{M}$ ), 6  $\mu\text{l}$  (72  $\mu\text{M}$ ), 7  $\mu\text{l}$  (84  $\mu\text{M}$ )를 각각 가하여 screening하였다.

## ④ Topoisomerase II drug screening assay(13)

Supercoiled DNA (250 mg/ml) 1  $\mu\text{l}$ , 5 $\times$ topoisomerase II assay buffer 2.5  $\mu\text{l}$ 를 함께 넣고, 이 반응 용액에 amsacrine (*m*-AMSA; topoisomerase II inhibitor)를 최종 농도 200  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 2 mM, 10mM로 각각 가한 다음, 각 반응용액의 부피를 증류수로 9  $\mu\text{l}$ 가 되도록한다. Topoisomerase II (2 units/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 를 가하였고 이하 topoisomerase I drug screening assay와 같은 방법으로 수행하였다.

## 연구결과

### 1) 수삼에서의 당단백질인 GMP 분리정제

확립된 분리 protocol에 따라 정제를 하였을 때, 여러 chromatography 방법을 이용하였음에도 불구하고 GMP 단백질 밴드보다 약간 더 큰 분자량의 단백질 밴드를 제거하기가 어려웠다. 이에 따라 확립된 방법을 재고하여 새로운

protocol을 시도하였으며 이 방법으로 적어도 순수한 GMP를 얻는데 성공하였다고 판단되었다. 시료 100g 중심부분을 얻어, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.01%  $\text{NaN}_3$ 와 함께 분쇄하였다. 단백질의 용출은 280 mM 흡수도로, 각 단계별 단백질의 순도는 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 분쇄한 homogenate를 여과하고 원심분리하여 얻은 상등액을 ammonium sulfate 25-80% 포화 농도에서 분리한 다음, Sephacryl S-100 column (2.6×70cm)으로 분리하였고 (Fig. 5), FPLC용 Resource Q와 0-1 M NaCl 직선 농도구배를 사용하여 다시 분리하였다. GMP 분획의 SDS-PAGE 수행한 결과, gel filtration와 ion exchange를 이용한 분리에서 66 kDa 단백질은 무척 제거하기 힘든 단백질이었는데 66 kDa 부위의 밴드가 완전히 제거되었음을 알 수 있었다. GMP 분획을 모은 다음, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) 용액을 사용하여 투석한 다음, FPLC용 Mono P column (5/5)를 이용하여 pH

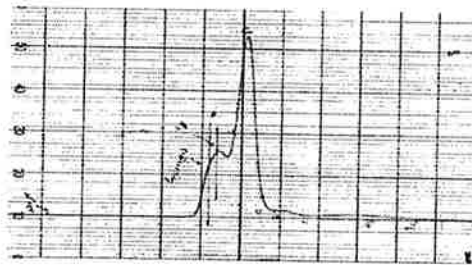


Fig. 5. The elution profile of GMP from ginseng roots after Sephacryl S-100 column(26 mm x 300 mm), flow rate: 60 ml/hr.

gradient (pH 5-7)로 분리하였다 (Fig. 6). 제거하기가 가장 어려웠던 GMP보다 약간 더 큰 분자량을 갖는 단백질 밴드가 Mono P를 이용하였을 때 거의 제거되었음을 확인하였다. 이는 SDS-PAGE로 분석해본 결과, 최종적으로 20 kDa이하의 단백질로부터 GMP를 분리해낼 수 있었다. Resource Q column을 다시 사용하였을 때의 SDS-PAGE 분석을 한 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

## 2) 홍삼뿌리에서의 펩타이드 분리

1차년도에서 확립된 분리 protocol에 따라 정제를 하였을 때, 여러 FPLC column들을 이용하였음에도 불구하고 구조분석을 위한 순수분리가 매우 어려웠다. 확립된 방법을 재고하여 새로운 protocol을 시도하였으며 적어도 TLC 상으로 순수하게 분리되었다고 판단되었다.

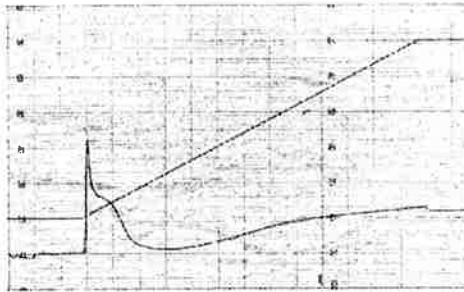


Fig. 6. The elution profile of GMP from ginseng roots using mono P5/5 starting buffer(1.5 ml): 25 mM bis-tris/HCl, pH 7.1, and elution buffer (6 ml): PolyBuffer 74/HCl, pH 5.0. pH gradient: pH 7.1-5.0

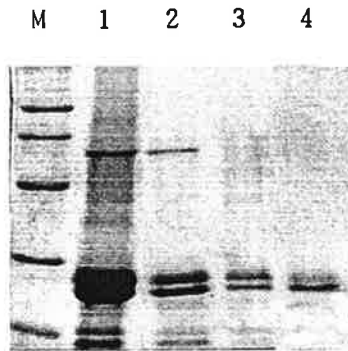


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of purified GMP from each chromatography step. Lane M : molecular weight markers, lane 1: crude extract, lane 2: after sephacryl S-100, lane 3: after resource Q, lane 4: after Mono P.

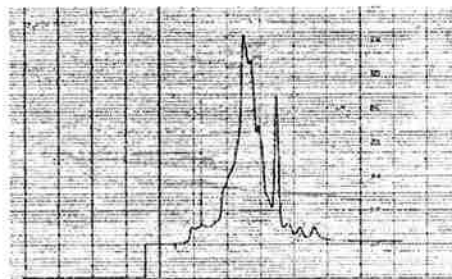


Fig. 8. The elution profile of red ginseng crude extract after Superdex peptide FPLC. flow rate: 60 ml/hr.

홍삼 추출물을 펩타이드용 FPLC column superdex peptide에 직접 apply하여 500에서 7000kDa 사이의 분자량 범위내에서 분리하였고 (Fig. 8), 이들 중 생리활성을 보유하고 있는 분획을 다시 Pep-RPC FPLC를 이용하여 분리한 다음 (Fig. 9). 이 분획들의 분리정도를 TLC로 확인한 결과 순수한 분리가 되었다고 판단되었다 (Fig. 10).

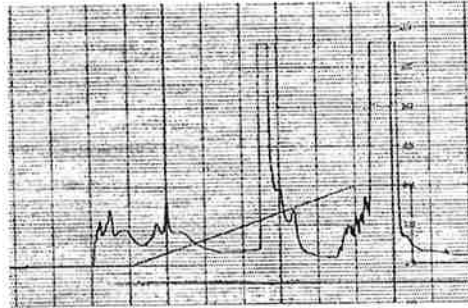


Fig. 9. The elution profile of red ginseng crude extract after PepRPC FPLC. flow rate: 60 ml/hr. starting buffer: buffer A/water, 1:9, 15% NaCl, elution buffer: buffer A/water/acetonitrile, 2:3:15, buffer A: 0.5% (w/w) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%), pH 2.5(NaOH).

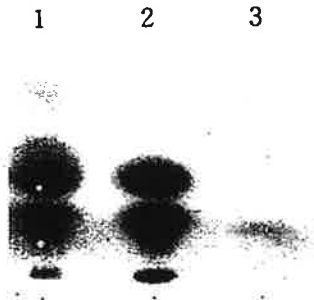


Fig. 10. TLC analysis of each purification step of red ginseng extract, lane 1: crude extract, lane 2: superdexpeptide fraction (major peak), lane 3: PepRPC fraction(3번째 peak). Solv, butanol:acetic acid:water=4:1:1

### 3) 홍삼뿌리에서 추출된 펩타이드분획의 생리활성 연구 항산화성 활성연구

분리된 분획에 대한 항산화성 측정을 수행하였고, 항산화성 측정시 sample의 hydrophobicity가 중요한 인자임이 실험 중에 발견되어 sample을 소니추출물에



가할 때 ethanol과 일정 성분비로 혼합한 다음 상대적으로 더 높은 활성수치를 얻게 되었다. 여러 분획 중에서도 항산화성이 상대적으로 높은 major peak 분획은 다시 RPC HPLC를 통하여 2개의 peak를 얻었고 이 중에서 한 개의 분획 만이 (#17-1) 57%의 유의성을 보이는 항산화성을 보유하고 있었다. Table 1에 나타난 바와 같이 #17-1 성분의 항산화성은 유의성있는 결과라고 사료되며 이 성분에 대한 Mass spectrometry와 NMR을 이용한 성분구조 분석을 수행하기 위한 대량생산을 시도하였으나, 의외로 펩타이드 분획의 분리정제가 재현성이 부족하였다.

Table 1. 홍삼 추출물 분획의 항산화성

분획	흡광도	항산화성(%)
BHT(0.1ppm)	0.39	79
major peak on superdex	0.285	90
#17-1 on RPC	0.605	57
#17-2 on RPC	1.333	-
#17-3 on RPC	1.349	-

#### 항보혈성 활성연구

양 적혈구 또는 토끼 적혈구 희석액 40  $\mu$ l에 160  $\mu$ l의 증류수를 가하여 완전히 용혈되게 한 후, 0-100%로 희석하여 405 nm 또는 540 nm에서 적혈구 용혈액 농도와 흡광도 상관관계를 기준으로, 보체 결합반응을 3회 반복으로 진행하여 측정된 용혈 흡광도를 용혈정도로 환산하여 각 실험구의 용혈율 (% hemolysis)을 계산하였다. 이 실험에서는 표준용혈 조건과 동일한 농도로 감작적혈구를 증류수로 용혈한 실험구와 56°C에서 30 분간 정치하여 불활성화된 보체 실험구를 함께 측정하여 각각 최대 및 최저 용혈값으로 하였다. 시료 감정시 감작적혈구 대신에 동량의 GVB\*\*용액을 넣은 실험구를 추가하여 시료 색소에 의한 흡광도를 보정하였다. 항보혈성 활성측정은 생명공학연구소에 의뢰를 하여 수행하였으며, Table 2에 나타난 바와 같이 홍삼에서 얻은 분획의 항보체성 활성이 높다는 것을 알 수 있었다. 앞의 표에서 GMP는 수삼에서 얻은 주요 단백질의 분획이 보유한 항보체성 활성(약 87%)이다. #9(홍삼)과 #10(홍삼)은 각각 FPLC 분리전 단계에서 얻은 분획이며 이 중 #5 분획만이 약 30.1%의 유의성을 갖고 있음이 발견되었다. #5 분획은 또한 정상과 내백에서 차이를 보이는 두 개의 분획중 하나라

는 것이 매우 흥미로운 점이였다. 특히 #9와 #10의 활성이 높으며 이들 역시 major peak으로 부터 분리된 분획이라는 점에서 앞으로 구조분석이 끝났을 때 이들의 활성과의 관계를 증진시킬 수 있는 가능성이 높다고 사료되었다.

Table 2. 수삼 및 홍삼 분획에 대한 항보혈성 결과

Test Sample	O.D (S.D)	Inhibition (%)
control	control	control
GMP (수삼)	0.132	86.6
#3(홍삼)	0.844	13.8
#4(홍삼)	0.864	11.7
#5(홍삼)	0.685	30.1
#6(홍삼)	0.968	-3.6
#7(홍삼)	0.886	5.1
#8(홍삼)	0.894	4.3
#9(홍삼)	0.166	82.2
#10(홍삼)	0.216	76.9

In vitro topoisomerase 저해활성 연구

Agarose gel electrophoresis로 in-vitro topoisomerase activity에 대한 저해성을 관찰한 결과 홍삼 펩타이드 분획중 #2, 4, 5에서 저해활성이 발견되었다 (Fig. 11). 특히 topoisomerase I 에 대한 저해성이 뚜렷이 나타났으며 이 분획들은 major peak와는 다른 분획에서 분리되었으며, 따라서 항산화성과 항보혈성

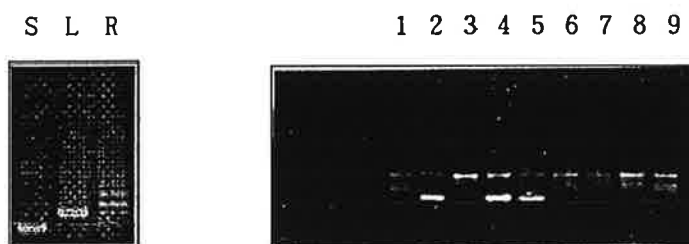


Fig. 11. Inhibition of topoisomerase activities by the fractions partially purified from red ginseng extracts. 1% agarose gel was used and stained with ethidium bromide. S : supercoiled DNA; L : linear DNA; R : relaxed DNA.

연구결과와는 다른 측면에서의 연구가 절실히 필요하다고 보며, 이들 분획내의 물질 동정연구는 의미있는 일이라고 판단되었다.

#### 4) 분리된 당단백질 및 당펩타이드의 당분석 및 당의 특성 및 서열 조사

고려인삼 주요단백질 GMP-25에 대한 생화학적 분석으로 올리고당 함유정도를 가수분해 효소를 이용하였다. 올리고당으로부터 N-acetylneuraminic acid를 제거하는 NANase II, 이당류 Gal( $\beta$ -1,3)GalNAc( $\alpha$ 1)를 Ser/Thr residue로부터 제거하는 O-Glycosidase, NP-40 (detergent), 올리고당을 Asn으로부터 제거하는 PNGase F를 이용하여 먼저 고려인삼에 결합되어 있는 당을 가수분해 시켰다. 이 반응액을 12% SDS-PAGE를 수행하여 단백질 밴드의 이동정도를 확인하였다. 고려인삼 주요 단백질 GMP가 NANase II, O-Glycosidase, PNGase F에 의한 가수분해를 통해 1 kDa 정도의 분자량 감소되는 것이 발견되었다.

이 외에도 고려인삼 내의 당단백질을 탐색하는데 있어서 SDS-PAGE를 수행한 후에, PAS 염색, Ruthenium red 염색, Stains-all 염색 등을 실시하였다 (data not shown). PAS 염색 방법은 고려인삼 GMP에 있어서 가장 효과적인 염색이었다. 그러나 분홍색으로 염색된 당단백질 밴드가 gel 상에서 영구적으로 지속되지 못하는 단점이 있었고, Schiff's reagent로 염색을 할 때 암실에서 최소 24 시간이 소요되었다. 당단백질 염색의 또다른 방법으로 Thymol-sulfuric acid 염색방법을 시도하였고, 또한 SDS-PAGE를 실시한 후에 Stains-all을 사용하였다. Ruthenium red 염색에서는 marker 단백질 역시 분홍색으로 염색됨으로써 오히려 non-specific binding을 보여 주었고 calcium binding protein의 가능성은 없다고 생각된다. 그러나 enzymatic deglycosylation을 수행한 후에 SDS-PAGE 분석에서 밴드가 낮은 분자량쪽으로 이동하는 것으로 보아서 탄수화물을 포함하는 당단백질임이 확인되었다. 또한 band shift가 약 1 kDa 정도 이동하는 것으로 보아 최소한 5-6개의 올리고당이 결합되어 있는 것으로 사료된다. Enzymatic deglycosylation을 수행한 결과 고려인삼 주요단백질에는 당이 결합되어 있음을 알 수 있었고 결과적으로, 염색방법을 이용하는 것보다는 효소적 방법을 이용한 방법이 더 유용한 것으로 판단된다. Calcium binding protein을 검색하기 위해 Ruthenium red를 사용하였고, 이 염색방법을 이용하여 진핵세포의 protein들을 선택적으로 염색하여 간접적으로 calcium binding protein을 확인할 수 있다고 보고된 바 있다. 이들 당단백질 및 calcium binding protein의 검증 결과를 Table 3에 요약하였다.

고려인삼 GMP에서 topoisomerase (I, II)에 대한 저해효과나 항보체활성에 이러한 당들이 독자적으로 기여할 가능성을 배제할 수 없으므로 GMP의 당들을 분해시켜서 당과 단백질 부위의 활성을 각각 측정해보면 흥미로운 결과를 얻을

수 있으리라 본다. 또한 위에서 열거한 가수분해 효소들을 각각 처리한 다음 밴드의 이동정도 또는 Immunoblotting을 통해서 단백질에 결합되어 있는 당의 종류를 규명할 수 있으리라 본다. Topoisomerase는 transcription과 replication에 앞서 supercoiled DNA를 일시적으로 잘라줌으로써 DNA의 winding을 조절한다고 알려져 있다. Topoisomerase I의 Inhibitor로 camptothecin을 사용하였고 topoisomerase II의 inhibitor는 amsacrine (*m*-AMSA)을 실험에 이용하였다.

Table 3. 고려인삼 주요단백질의 특성분석 결과

분석대상	PAS 염색	Stains-all 염색	deglycosylation	ruthenium red
당단백질	pink	blue or purple	band shift	-
Calcium binding protein	-	-	-	red
고려인삼 GMP	pink	purple	band shift	non-specific staining as red
분석결과	당단백질	당단백질	당단백질	-

이들 inhibitor는 topoisomerase (I, II)가 supercoiled DNA에 결합한 부위에 작용하여 topoisomerase가 DNA로부터 떨어져 나가는 것을 방해함으로써 supercoiled DNA의 winding을 제대로 조절할 수 없게 만든다. 현재 topoisomerase assay는 anticancer activity 측정을 위한 in vitro activity assay 방법으로 이용되고 있으며, 특히 인삼내의 성분이 in vivo에서 암세포에 대한 항암성을 갖고 있음이 알려져 있다.

## 제3항 3차년도 연구 개발 내용

- 1) 분리 정제된 당펩타이드의 구조분석을 위한 대량생산 체계확립 조건 탐색
  - N termical sequencing
  - 펩타이드 및 당 합성
- 2) 펩타이드 및 당 sequencing
- 3) 펩타이드 및 당 구조분석
  - NMR, Mass 및 x-ray 이용
- 4) 제품개발을 위한 당펩타이드 디자인
  - 모델링 및 최소에너지 계산

## 연구방법

### 1) 단백질 및 탄수화물 정량

전체 탄수화물, uronic acid 및 단백질의 양은 phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 방법(14), carbazole(15) and Lowry 방법(16)을 각각 Glc, GalA and bovine serum albumin 을 standard로 사용하여 결정하였다.

### 2) Gel filtration chromatography

Dialysis 한 crude extracts를 (5mg) Sephacryl S-200 column (1.5×90cm)에 apply 하였다. 그리고 a) low ionic strength 0.2M CH<sub>3</sub>COONa, b) high ionic strength 0.2M CH<sub>3</sub>COONa in 1M NaCl, pH=6.8, 용액으로 15ml/h의 속도로 유출하였다.

### 3) Monosaccharides 분석

가. Hydrolysis : Sample과 standard 각 1mg을 2M trifluoroacetic acid 1ml 에 녹여 100℃에서 10시간동안 glass ampules에서 N<sub>2</sub> 기체하에서 incubation 하였다. 식힌 다음 용액을 rotary-evaporation을 수행하였다.

나. Reduction : Sample과 standards를 500μl 0.05M NaOH과 2mg of NaBH<sub>4</sub>에 각각 가하고 room temperature에서 4시간동안 incubation 시켰다. 환원후 excess sodium borohydride는 glacial acetic acid를 가하여 제거하였다.

다. Acetylation : 환원된 monosaccharides는 0.5ml pyridine, 0.5ml acetic anhydride를 가하여 acetylation 시켰다. 실온에서 12시간동안 samples이 건조 상태가 될 때까지 evaporation 하였고, 100μl toluene을 용액에 첨가하여 완전히 evaporation 하였다. 건조된 residues를 0.5ml chloroform/water(1:1)에 녹

이고 sample을 vortex하였다. 1,000g에서 2min, room temperature에서 원심분리를 하여 organic과 aqueous phases를 분리하였다. Organic phase는 진공에서 evaporation하였다.

#### 4) Methanolysis를 이용한 Monosaccharides 분석

건조된 sample과 standard mixture에 1ml 0.625M methanolic HCl (methanolic HCl은 acetyl chloride를 100ml dry methanol에 첨가하여 얻는다)를 첨가하였다. Methanolysis는 sealed ampules에서 수행되었고 80°C 밤새동안 incubation시켰다. 식힌 다음 methanolic HCl은 진공상태에서 evaporation 하였다.

#### 5) Trifluoroacetylation (혹은 acetylation)

건조된 residues은 dichloromethane (200 $\mu$ l), trifluoroacetic acid (200 $\mu$ l)에 의하여 trifluoroacetylation 하였다. Tube를 빨리 제거하고 room temperature에서 밤새동안 uncubation 하였다.

#### 6) GS-MS에 의한 분석

Sample (1-3 $\mu$ l)을 gas chromatograph (SHIMADZU, GC-17A) CBP5 25-m fused silica capillary column (0.25mm i.d.)에 가하고, sugar derivatives를 flame-ionization detector을 이용하여 측정하였다. Oven temperature program은 start temperature 140°C 그리고 점차 증가하여 4°C/min의 gradient로서 270°C까지 높였다. GC-MS는 생명공학원 공동기기실에 의뢰하여 수행하였다.

#### 7) Protease 처리

Sample을 protease와 1:20 의 비율로 섞어 chymotrypsin과 trypsin은 0.1M ammonium bicarbonate (pH 8.0)를, pepsin은 0.1% Trifluoroacetic acid (pH2.0)를 반응용액으로 37°C 2시간동안 반응시켰다. 이때 사용된 sample은 순수분리된 GMP를 사용하였다.

#### 8) GS-MS에 의한 분석

Sample을 gas chromatograph CBP5 25-m fused silica capillary column에 가하고, sugar derivatives를 flame-ionization detector을 이용하여 측정하였다. Oven temperature program은 start temperature 140°C 그리고 점차 증가하여 4°C/min의 gradient로서 270°C까지 높여 사용하였다.

#### 7) ELISA를 이용한 활성저해작용과 *H. pylori* 결합 저해측정

Mucin에 conjugated 된 peroxidase를 spectroscopic 방법으로 정량 측정하며 ELISA plate를 이용한다. 활성저해작용은 또한 *H. pylori* 에 따른 hemagglutination을 microscopy를 이용하여 visual inspection을 하며(17), gastric epithelial cell을 이용한 저해 작용은 digital camera image system(CCD detector)을 사용하여 측정하였다.

#### 8) *Helicobacter pylori* 박테리아는 fetal bovine serum을 포함하는 Brucella

broth에서 10% CO<sub>2</sub>, 37 °C 조건에서 키운 후 harvest 하여 -70 °C에 보관하여 실험에 사용하였다.

#### 9) 단백질 결정화 조건 탐색 및 single crystal 탐색

침전제로는 유기물로 2-propanol, 2-methyl-2,4-pentanediol과 polymer로 polyethyleneglycol (PEG)-400, PEG-1500, PEG-4000, PEG-8000과 ammonium sulfate 등을 들 수있다. 일반적으로 단백질 결정화는 단백질의 포화상태 (supersaturation)에서 이루어지는데 그 결정화 조건은 전혀 예측할 수 없고 위에 열거한 염, 완충액, 그리고 침전제 등 여러조건을 조합에 의해서 일일이 대응하면서(factorial search) 발견하게 된다. 본 연구에서는 hanging-drop vapor diffusion method를(18) 이용하여 screening 조건을 좀더 세분화하여 탐색하였다. 현재 생체고분자 결정화에 많이 이용되고 있는 sparse matrix sampling technique(19)으로 결정화 screening의 시간을 단축하였다.

#### 10) 항산화성 홍삼시료에서 펩타이드 분획 분리

홍삼을 20mM Tris-HCl (pH8.0) 완충용액에 넣고 불려서 분쇄한 후 13000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다. 젤여과 크로마토그래피(Gel filtration chromatography) Superdex Peptide 칼럼을 통과한 시료용액은 증류수를 사용하여 0.5ml/min의 유속으로 용출하였고 각 분획은 2분 간격으로 회수하였다. 크로마토그래피 결과는 흡광도 226nm에서 분석하였다. 음이온 교환 크로마토그래피(Anion-exchange chromatography): 항산화 활성을 보이는 분획을 Resource-Q 칼럼을 이용하여 20 mM Tris 완충용액상에서 0.5 M NaCl을 선형 기울기로 첨가하면서 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. 이 때 유속은 0.5 ml/min, 각 분획은 2분 간격으로 회수하였고 흡광도 226 nm에서 분석하였다.

## 연구결과

### 1) Low and high ionic strength buffer를 이용한 Gel filtration chromatography

주요 단백질(GMP)을 조사하기 위하여 poly- 혹은 oligo-saccharides와 complex를 만들었다. Sephacryl S-200을 이용하여 low and high ionic strength buffer를 이용하였다. Elution profile 이 Fig. 12에 나타나있다. Major protein peak의 elution profile이 carbohydrates와 잘 일치함을 알 수 있다. 그러나 high ionic strength에서의 elution profile은 sugars를 phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 방법으로 관찰하였을 때 GMP와 같은 곳에서 발견되지 않았다. 특히 carbazole

method로는 어떠한 sugars도 관찰되지 않았다.

## 2) Gel filtration chromatography

Elution profile을 서로 비교하여 ionic strength에 따른 gel chromatography 결과가 Fig. 13에 나타나 있다. Gel filtration chromatography를 증류수로 유출하였을 때 GMP를 상당량 얻을 수 있었다. 전체 carbohydrate와 protein 양은 각각 7%와 86%임을 발견하였다.

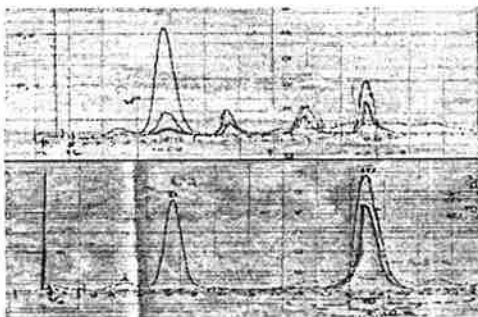


Figure 12. A comparison of the elution profiles of ginseng extracts when a low (upper panel) and a high (lower panel) ionic strength buffer was used.



Figure 13. Gel Filtration of dialysed crude extract on column with Sephacryl S-200. Flow rate 15ml/h.

## 3) GC-MS를 이용한 탄수화물 분석

Carbohydrate 분석의 GMP에 대한 결과가 Fig. 14에 나타나 있다. 탄수화물의



동정은 mass spectrum을 이용하였다 (Fig. 15a and 15b). GMP는 아주 미세한 양이지만 neutral monosaccharides이 발견되었고, 특히 arabinose (characteristic base fragments with m/e 103, 115, 145, 187, 217, 289)와 galactose (115, 139, 187, 217, 259, 289, 361)가 관찰되었다. GMP에 결합되어 있는 탄수화물의 조성에 대한 연구는 우선 GMP의 탄수화물 부위를 가수분해하는 것으로 시작하였으며 GC 및 GC-MS를 사용하여 수행된 실험 protocol은 다음과 같았다.

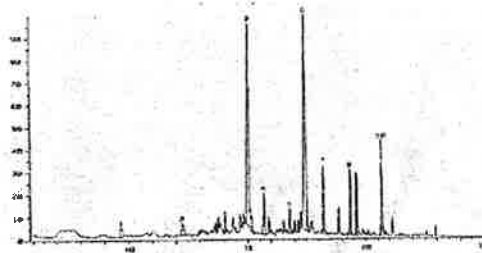
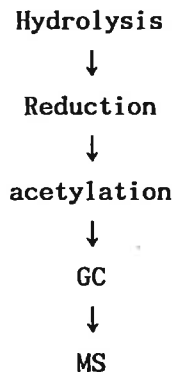


Figure 14. GC-Chromatography of acetates of alditols of sugars from fraction GMP : 3-peracetate of arabinitol

GMP와 탄수화물 부위와의 관계를 조사하기 위하여 GMP가 acidic poly- 혹은 oligo-saccharides와의 complex 가능성에 대해서 조사하였다. 우선 인삼의 뿌리에서 과량의 polygalacturonic acids가 측정되고 있다는 점은 GMP의 positive charge를 갖고 있는 아미노산 잔기와 negative charge를 보유한 polygalacturonic acids와의 상호작용이 매우 가능할 것으로 사료되었다. 인삼 내 유리 아미노산 중에서 가장 많이 발견되는 아미노산이 arginine이라는 점은 시사하는 바가 크다고 본다. 인삼 뿌리에서 주요단백질 분획인 GMP는 neutral

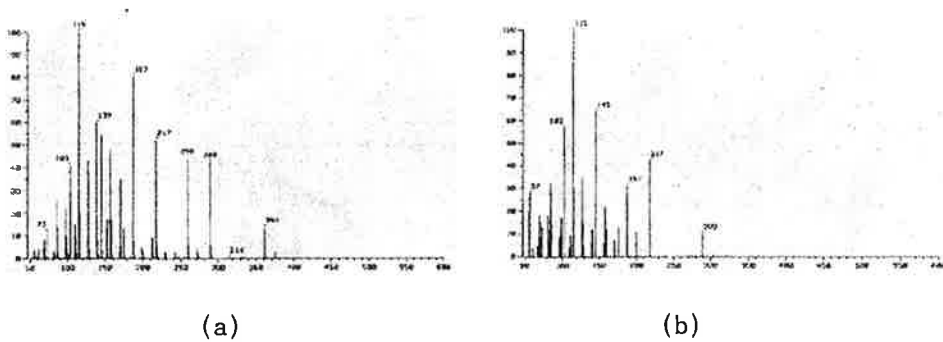


Figure 15 : (a) Mass-Spectrum of Arabinose, (b) Mass-Spectrum of Galactose.

sugar인 arabinose와 galactose를 함유하고 있음이 GC-MS를 통하여 확인되었다. 뿐만 아니라 carbazole method에 의하여 uronic acid도 보유하고 있는 것으로 판단되었다 (Fig 14, 15). 이들 탄수화물은 GMP 자체의 활성 외에 여러 가지 생리활성을 보유하고 있음이 알려져 있고, carbohydrate 조성으로 xylose, arabinose, galactose, galacturonic acid, glucose, rhamnose 등이 함유되어 있다고 알려져 있다. 특히 이들은 immune system에 있어서 여러 가지 활성을 보유하고 있는 것으로 보고되어 있기 때문에 탄수화물의 흥미로운 활성에 대하여 연구결과가 기대되고 있다.

#### 4) Peptide mapping을 위한 예비실험

Protease에 resistant 한 점은 앞서 기술된 바와 같다. Chymotrypsin, trypsin에 대하여 저항성을 갖고 있는 것으로 판단되었으며, protease Xa에는 부분적으로 가수분해되며, 최근에 pepsin을 이용한 결과는 순수분리된 GMP를 pepsin으로 처리하였을 때 가수분해가 매우 빠르게 완전히 진행된다는 사실을 알게 되었다 (Fig. 16). Pepsin은 위장내에 존재하는 소화 가수분해 효소로서 pH 1-2에서 최적 활성을 보이는 효소이다. 일반적으로 인삼의 뿌리를 식용한 뒤 위장내에서 GMP의 가수분해 결과 여러 가지 peptide로 분해되는 것을 가정할 때 이들 GMP 가수분해 결과의 peptide의 생리활성 보유가 가능하다고 판단된다. GMP에 대한 N-terminal sequencing 및 amino acid 조성은 각각 기초과학연구지원센터에 의뢰하여 결과를 얻었다 (Table 4, 5). 일반적으로 인삼내 유리 아미노산 조성에 의하면 arginine이 가장 많은 것으로 알려져 있는데 반하여, GMP 아미노산 조성결과에 의하면 주요단백질의 아미노산에는 그러한 경향을 보여주

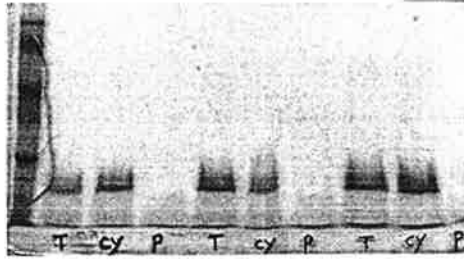


Figure 16 : SDS-PAGE analysis of protease-treated GMP. T : Trypsin, Cy : chymotrypsin, P : Pepsin

고 있지 않았다. 또한 GMP의 N-terminal sequencing으로 부터 약 15개의 아미노산의 서열을 확보해 놓고 있으며, BLAST를 통한 서열 similarity를 확인한 결과 이제까지 알려진 단백질과의 유사성을 찾지 못하고 있다. 아마도 전혀 다른 단백질일 가능성도 배제할 수 없지만, 가수분해를 통한 펩타이드의 아미노산 서열

Table 4. GMP25의 아미노산 조성

AA	MOL(%)	AA	MOL(%)	AA	MOL(%)
Cya*	3.43	ARG	3.20	MET	0.94
ASX**	13.38	THR	6.11	ILE	3.26
GLX**	11.98	ALA	8.43	LEU	8.13
SER	5.30	PRO	5.30	PHE	5.11
GLY	7.39	TYR	2.13	TRP	1.53
HIS	3.43	VAL	4.51	LYS	6.42
Total					100

\*Cya mean the sum of cysteine and cytine

\*\*ASX, GLX mean the sum of asparagine & asparatic acid and glutamine and glutamic acid, respectively.

Each number is expressed as picomol.

Table 5. GMP의 N-terminal sequencing 및 BLAST database 분석의뢰 결과

N-Arg-Asp-Tyr-Pro-Ala-Ala-Met-Phe-Ala-Leu-Arg-Gln-Gln-Trp-Pro-

Sequences producing High-scoring Segment Pairs	High Score	Smallest Sum	
		Probability P(N)	N
Q07471 THI3_YEAST thiamine metabolism regulatory prot	45	0.91	1
Q44292 NRTA_ANASP nitrate transport protein nrta	44	0.96	1
P21438 MYC_FLVTT myc transforming protein	30	0.9995	2
Q28350 MYC_CANFA myc proto-oncogene protein (c-myc)	30	0.9995	2
P06877 MYC_FELCA myc proto-oncogene protein (c-myc)	30	0.9995	2
P01106 MYC_HUMAN myc proto-oncogene protein (c-myc)	30	0.9995	2
P49033 MYC_HYLLA myc proto-oncogene protein (c-myc)	30	0.9995	2
P01108 MYC_MOUSE myc proto-oncogene protein (c-myc)	30	0.9995	2
P09416 MYC_RAT myc proto-oncogene protein (c-myc)	30	0.9995	2
Q28566 MYC_SHEEP myc proto-oncogene protein (c-myc)	30	0.9995	2

이 가능해지면 좀 더 확실한 정보를 얻을 수 있으리라 사료되었다.

5) ELISA를 이용한 활성저해작용과 *H. pylori* 결합 저해측정

수용성 추출물 중에서 이온교환 크로마토그래피로 분리된 산성 다당류 (acidic polysaccharide)는 in vitro hemagglutination을 저해하며 그 효과가 다른 다당류에 비하여 상대적으로 높았다. 일반적으로 다당류에 의한 세포결합의 저해효과는 mg/ml 단위의 높은 농도를 필요로 하는데 비하여, 분리된 다당류는 10배 이상의 낮은 농도에서 적혈구의 agglutination 저해활성을 보이고 있다는 점에서 활성이 높은 당배합체로 판단되었다 (Fig. 17).

5) 항산화성 홍삼시료에서 펩타이드 분획 분리

수용성 홍삼 추출물을 겔 여과 크로마토그래피 칼럼을 통과시켜 분자량의 차이에 따라 6개의 분획으로 분리하였다 (Fig. 18). 각 분획의 항산화 활성을 측

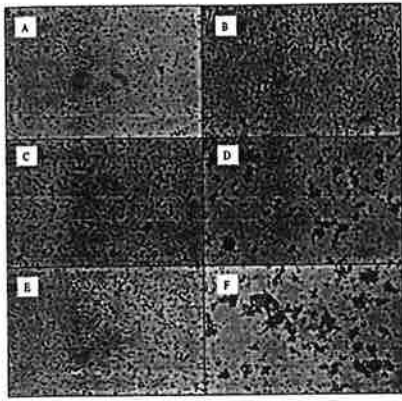


Fig. 17. Micrograph images of hemagglutination induced by *Helicobacter pylori*. 2% Erythrocytes were treated by trypsins. The hemagglutination inhibition by purified polysaccharides is shown at the concentration of (A) 1 mg/ml, (B) 0.5 mg/ml, and (C) 0.25 mg/ml. In (D) the polysaccharides were treated with pectinases. (E) negative control with erythrocytes only and (F) positive

control with erythrocytes and *H. pylori*.

정한 결과 분획D가 가장 높은 항산화성을 보였다. 분획D를 다시 분리하기 위하여 음이온 교환 크로마토그래피를 실시하여 Fig. 19의 결과를 얻었다. 분획I와 II는 비슷한 강도의 항산화 활성을 보였다. 분획I은 수지에 결합하지 않는 분획이고 상당량의 당이 혼합되어있는 것을 확인할 수 있었다. 반면 분획II는 피크 크기가 분획I보다 훨씬 작음에도 불구하고 비슷한 강도의 활성을 보이고 분리가 용이할 것으로 판단되어 분획II를 다음 실험의 시료로 결정하였다.



Fig. 18. Gel filtration chromatogram. Crude extract of red ginseng was eluted on the Superdex Peptide column with distilled water at flow rate 0.5 ml/min and each fraction volume was 1 ml.

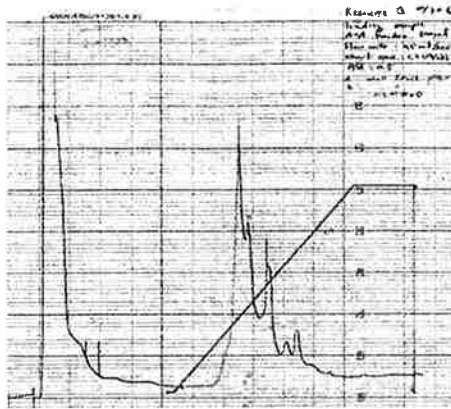


Fig. 19. Anion exchange chromatogram using Resource-Q column. The fraction D obtained from gel filtration was eluted with 20 mM Tris-Cl, pH8.0 with increasing gradient of 0.5 M NaCl.

## 제 3 장 결 론

### 제1절 연구결과 및 논의

#### (1) GMP25의 순수분리와 특성연구

주요단백질인 GMP의 분리방법 protocol은 시행착오를 거듭하였다. 여러 chromatography 방법을 이용하였음에도 불구하고 GMP 단백질보다 약간 더 큰 분자량의 단백질 밴드를 제거하기가 어려웠다. 2차년도 후반기에 와서야 확립된 방법을 재고하여 새로운 protocol을 시도하였으며 이 방법으로 순수한 GMP를 얻는데 성공하였다고 판단된다 (Fig. 7). 특히 Resource Q FPLC와 chromatofocusing의 분해능이 탁월하여 순수분리가 가능하였다. 그러나 chromatofocusing은 수행하기가 쉽지않고, 산업적으로 이용하기에 어려운 단계이므로 비교적 쉬운 단계로 할 수 있도록, 3차년도에는 이를 대신할 수 있는 FPLC를 수행함으로써 순수분리를 확립할 수 있었다. 우선 trypsin과 chymotrypsin에 resistant한 GMP의 특성을 살려, 이들 효소를 이용하여 crude extract를 가수분해한 분획을 ammonium sulfate precipitation 하였다. Trypsin과 chymotrypsin으로 처리하였을 때, 25-65 kDa 사이 분자량의 단백질들이 거의 제거됨을 확인할 수 있었다 (Data not shown). Dialysis 한 다음 DEAE ion exchange chromatography, Superdex 75 FPLC, Resource Q 다시 Superdex 75 gel filtration FPLC를 이용하여 최종 순수분리된 GMP를 얻었으며 (Fig. 20), 현재 본 실험실의 protocol로 이용하고 있다.

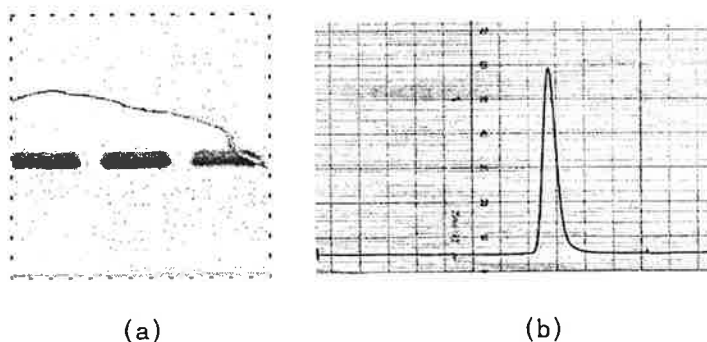


Fig. 20. (a) An SDS-PAGE result of Superdex 75 eluted GMP and (b) Superdex 75 gel filtration FPLC elution profile of GMP, flow rate: 0.25 ml/min.

순수분리된 GMP는 SDS-PAGE상에서 25kDa의 단일밴드로 나타나지만, 시간이 경과 하거나 분리 batch에 따라서 2개의 밴드를 보여주고 있다. 이들에 대한 단백질 특성연구를 수행한 결과 2개의 밴드를 보여주는 단백질은 N-terminal sequencing이 같음을 확인하였다. N-terminal 아미노산 서열이 같기 때문에, GMP는 인삼 뿌리세포내에 존재하는 isoform 단백질의 가능성, 혹은 post-translational modification이 일어났을 가능성 외에도 단백질 분리정제 과정 중에 변형되었을 가능성도 배제하지 않고 있다. GMP 단백질 분리정제에 있어서 유사한 두 단백질을 분리하는데 기술적 어려움에도 불구하고 현재 GMP의 N-terminal sequencing 실험으로부터 약 15개 아미노산의 서열을 확보해 놓고 있으며, 단백질 database를 통한 아미노산 서열 similarity를 확인한 결과 이제 까지 알려진 단백질과의 유사성을 찾지 못하고 있다. 아마도 아직까지 밝혀지지 않은 전혀 다른 단백질일 가능성도 있겠지만, 가수분해를 통한 펩타이드의 아미노산 서열이 가능해지면 좀 더 확실한 정보를 얻을 수 있으리라 사료된다. 흥미로운 결과로서 아직은 preliminary한 자료이지만, 현재 C18 column을 이용하여 두 가지의 elution peak를 보여주는 분리과정을 수행하고 있다 (Data not shown). 이와 같은 두 개의 peak이 과연 앞서 기술된 두 개의 band protein과 일치하게 되면 매우 고무적인 결과라고 사료된다. 일반적으로 recombinant protein으로 발현되는 경우, 같은 단백질이면서도 두 개의 단백질 밴드로 나타나는 경우가 있기 때문에 C18 reversed phase column으로 분리가 가능하면, 분리정제에 일반적인 적용이 가능한지에 대해서도 탐색하려고 한다.

순수분리된 GMP는 항보체 활성화에 유의성 있는 결과가 확인되고 있다 (Table 2). 앞으로 GMP가 가수분해되어 생성되는 펩타이드 분획들에 대한 활성검증 실험과 분리를 통해서 좀더 개량된 활성 펩타이드의 개발이 가능하리라 보며, 또한 진행 중인 탄수화물 부위의 분석실험이 완료되면 탄수화물과의 상호작용에 대한 정보를 얻을 수 있으리라 본다. GMP가 갖고 있는 또하나의 특성, 즉 많은 가수분해 효소에 대해 resistant한 점에 탄수화물 부위가 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 생리활성 연구로부터 얻은 결과는 앞으로 분리되는 단백질 및 기타성분의 분자수준의 기작연구에 좋은 영향을 미치리라 예상된다.

1차 SDS-PAGE 결과에 따른 단백질 밴드의 정량적인 상대적 차이점은 결과가 reproducible 하고 비교 분석하는데 1일 이내에 처리가능하다. 따라서 두 삼의 차이를 이용한 제품 비교의 지표로 쉽게 이용될 수 있으며 요즘 인삼 전매제도의 폐지와 함께 대량 수입되고 있는 중국삼과의 비교에도 응용할 수 있으리라 판단이다. 더욱이 2차 전기영동을 통하여 좀 더 세밀한 비교분석을 할 수 있는



신축성을 갖고 있기 때문에 타국삼과의 비교분석에 적절하다고 본다. 국제적 추세인 생약의 규격화에 HPLC를 이용한 고려인삼의 분석이 앞으로 이용될 가능성이 있기 때문에(20) 고려인삼의 수용성 단백질 및 펩타이드 성분의 분석에 전기영동과 HPLC를 혼합한 방법의 구성을 연구해 볼 필요가 있다고 판단된다.

결정구조 분석을 위한 GMP의 결정화 조건을 탐색하여 30% MPD, 0.1M Na acetate (pH 4.6), 0.02M calcium chloride에서 결정을 발견할 수 있었다. 이들이 X-선에 대하여 회절현상을 보이는지에 대한 자료는 얻을 수 없었다. 현재 5 mg 정도의 GMP를 이용하여 단일결정을 만드는데 최선을 다하고 있다.

## (2) 산성 다당류의 특성연구

당생물학(glycobiology)은 90년대 들어와서 기술적 방법의 개선에 따라 흥미로운 연구테마로서 자리잡고 있으며, 세포 표면의 당의 분포에 의존하는 여러 가지 중요한 생물학적 현상, 앞서 기술한 세포간 인식 즉, leukocyte-endothelial 세포결합 (cell adhesion), 바이러스나 박테리아의 특이 숙주세포와의 결합, 면역학적 암세포의 인식작용과 같은 현상에 매우 중요한 기능을 수행하고 있다. 이러한 기능연구를 수행하는데 이용되는 하나의 방법으로는 당배합체 혹은 이를 인식하는 lectin의 동정이 일차적일 것이다. 특히 세포 표면이나 단백질에 결합되는 당은 유전자에 의하여 직접 조절되는 것이 아니기 때문에 구조적 변형을 위한 engineering의 시도나 이를 위한 유전자조작이 어렵다. 따라서 일부는 합성 glycoconjugate의 디자인을 통하여 치료제(therapeutic agents) 약품을 개발하는데 노력을 경주하고 있다. 최근 carbohydrate-based receptor 및 selectin 저해제를 합성 디자인 함으로써 염증부위(inflammation site)에서 leukocyte와 내피세포(endothelial cell)의 결합 기작에 대한 연구가 보고 되었으며(21), *Helicobacter pylori*, influenza virus 및 HIV 감염을 저해할 수 있는 oligosaccharide 연구에 놀라운 진척을 보여주고 있다. 특히 *H. pylori*에 의한 인체 위점막 상피세포 결합에 관여하는 adhesin과 Lewis b antigen의 연구가 최근에 보고된 바 있다(22). *H. pylori*는 Gram-negative 박테리아로서 인체에 만성, 급성 위염, 위궤양 및 위암 등을 유발하는 것으로 알려진 병원체이다(23-25). 산업사회의 경우 60세 이상의 인구 중 과반수 이상이 이 박테리아에 감염되어 있으며, 개발도상국가에서는 대부분의 인구가 유년기부터 감염되어 있는 것으로 보고되어 있다(26, 27). 2살 부터 8살사이 유아의 경우 약 10%가 매년 감염되기 때문에 10대 청소년이 되면 거의 대부분이 감염되는 추세를 보이고 있다. 이전에는 위염, 위궤양과 같은 위장 질환이 일차적으로 위산

Table 6. 위장질환 치료 및 예방제제의 국내·외 연구개발 현황

개발회사	특허물질	비고
Glaxo Group (영국)	라니티딘 비스무트 사이트레이트(균역 제항생제)	위장질환 치료용 약제
Alpha washerman (이탈리아)	rifaximin 및 carrier(제약학적 조성물)	소화불량증 치료제
Pfeizer (미국)	메트로니다졸	박테리아 감염치료제
목암생명공학 연구소(한국)	MBRI-2 및 항체검출용 kit	항체검출용 진단키트
LG 화학 (한국)	vacuolating cytotoxin과 CagA를 이용한 항체진단용 kit 및 urease 융합유전자	항원제조방법 및 진단용 조성물, 효소제조방법
대웅제약 (한국)	박테리아 adhesin 발현 미생물 UreA와 B 재조합 미생물	재조합 미생물

(자료: 특허청 공개출원자료)

과다, 즉 과량의 HCl 분비에 기인하며, 원인으로 스트레스, 식품 및 유전적 요인 등에 의하여 염증이 생긴다고 여겼지만, 최근에 와서야 *H. pylori*에 의하여 감염되었을 때 염증이 발생한다는 것이 정설로 되어있다. 염증이 점막하층까지 퍼지게 되면 위궤양으로 발전하게 되고, 위암으로 바로 진행되는 것은 아니지만, *H. pylori*에 감염되면 위암으로 진행될 가능성이 3-5배정도 높아지는 것으로 알려지고 있다. 수년전까지 이들 질환의 치료를 위해 제산제 (antacids), 히스타민 수용체의 길항작용제 등이 사용되어 왔다. 미국 국립보건원은 90년대 중반에 와서야 *H. pylori*와 위장 질환과의 관계를 인정하여 tetracycline이나 amoxicillin과 같은 항생제의 사용을 다른 치료제와 병행하여 사용할 수 있도록 허용하고 있다(28). 그러나 항생제의 사용에 따른 인체내의 축적, 부작용 및 내성을 갖는 박테리아의 출현 때문에 궁극적으로는 위장 질환을 치료할 수 있는 대체약품의 개발이 요망되고 있다. 국내, 외 위장질환 치료제 및 예방용 제제의 개발 현황을 보면, 면역 시스템이나 항균제를 이용하거나 박테리아 세포외 배출 효소를 이용한 kit의 제조가 주류를 이루고 있으며 아직까지 세포인식에 관여하는 당배합체를 이용한 제제의 개발이 전무함을 알 수 있다 (Table 6).

위장 질환 발병 원인균인 *H. pylori*는 인체 위장내 점막부 상피세포에 결합하여 활동 및 증식함으로써 여러 가지 위장 질환의 직·간접적 원인으로 작용하고 있다. 적혈구 세포의 표면은 위점막 상피세포와 같거나 비슷한 탄수화물 조성을 보유하고 있으며 *in vitro*에서 *H. pylori*와 결합함으로써 응집현상(hemagglutination)을 일으킨다. 이는 세포와 세포간 결합 및 상호작용에 기인하는 것이다. 본 연구실에서 오랫동안 연구되어온 식물자원의 수용성 추출물 중에서 이온교환 크로마토그래피로 분리된 산성 다당류(acidic polysaccharide)는 *in vitro* hemagglutination을 저해하며 그 효과가 다른 다당류에 비하여 상대적으로 높다. 일반적으로 다당류에 의한 세포결합의 저해효과는 mg/ml 단위의 높은 농도를 필요로 하는데 비하여, 분리된 다당류는 10배 이상의 낮은 농도에서 적혈구의 agglutination 저해활성을 보이고 있다는 점에서 활성이 높은 당배합체로 판단된다 (Fig. 17). 당배합체인 산성다당류의 분리는 현재 ion exchange FPLC를 이용하여 해결하고 있지만, affinity나 gel filtration 및 다른 종류의 분리방법을 탐색하는 것이 일차적인 어려움으로 판단된다. 그만큼 다당류의 분리정제는 실험적으로 쉽지 않을 뿐만 아니라, 용해도가 매우 낮아 실험단계를 거치면서 yield가 감소하는 등, 단백질, 핵산과 같은 다른 macromolecule에 비하여 분리정제가 어려운 점이 실험에서 극복해야 할 기술적인 난제라고 판단된다. GC와 GC/MS를 이용한 탄수화물 조성, 특성 및 ELISA를 이용한 활성저해 작용과 gastric epithelial cell과의 결합저해 작용 및 가수분해 효소에 의하여 얻어지는 올리고당의 응용성에 대한 연구를 계획하고 있다.

당배합체 연구는 최근 급속히 발전하는 분야로서 이미 선진국에서는 당뇨병이나 항바이러스 치료 혹은 암치료제로서의 이용을 위해 glycosyltransferase 효소들에 의한 glycosylation 저해제를 개발하고 있는 실정이다(29). 당단백질의 경우 N-linked 혹은 O-linked 글라이코시딕 결합을 이루는 프로필에 따라 단백질의 아미노산 잔기 즉, asparagine 혹은 serine(threonine) 특이성 뿐만 아니라, O-linked는 다당류가 차례로 결합되고, N-linked의 경우 14개의 올리고당이 결합되고난 후에 processing되는 기작이 알려져 있다(30). Post-translation의 차이에 특이적으로 작용하는 효소의 저해제를 치료제로서 개발하기 위하여 선도물질 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 현재 국내에서도 활발히 이용되고 있는 올리고당 연구는 식품첨가제로서 탄수화물 자체를 이용하는데 그치는 분야이지만, 당단백질에 결합되어 있는 올리고당은 생화학적 분석기술에도 이용될 가능성이 크다. 당배합체의 합성을 통해 식물자원에서 주로 발견되는 lectin 단백질들의 분리정제나 항체의 생산, 세포 및 분자간 인식의 도구로서 진단분야에 이용되고 있다(31). 또한 세포 표면 올리고당을 이용하여 종양세포에 대한 백신이

용이라든지, xenotransplantation을 수반하는 tissue rejection을 막을 수 있는 올리고당에 이르기까지 그 이용은 급증하고 있다. 현재 세포표면의 glycoconjugate system을 바꾸어 보려는 "glycoform remodeling"이 제안되고 있는 실정이다(32).

식물자원에서 분리된 GMP25 탄수화물 결합단백질이 다당류와 결합하는 특징을 발견하여 다당류와의 상호작용에 대한 연구는 매우 의미있는 일이라고 판단된다. 단백질과 다당류의 결합에는 ionic interaction이 주된 결합에너지로 생각되며, *H. pylori*에 대한 저해활성을 보유한 산성 다당류도 이 범주에 속하는지에 대한 연구는 아직 되어있지 않다. GMP와 탄수화물 부위와의 관계를 조사하기 위하여 GMP가 acidic poly- 혹은 oligo-saccharides와의 complex 가능성에 대한 조사는 필수적이다. 특히 과량의 polyglucuronic acids가 측정되고 있다는 점은 GMP의 positive charge를 갖고 있는 아미노산 잔기와 negative charge를 보유한 polyglucuronic acids와의 상호작용이 매우 가능할 것으로 사료된다. Gel filtration chromatography를 통해서 GMP는 uronic acid와 ionic complex로 존재하며 이것은 다시 high ionic strength buffers에서는 서로 분리되는 것으로 보아 단백질-탄수화물 상호작용에 중요한 단서를 제공할 것으로 판단된다.

### (3) 펩타이드 분획의 특성연구

홍삼내에서 분리된 펩타이드 분획에 대한 생화학적 분석은 단순한 crude extract나 분획이 아닌 생리활성 물질의 동정과 순수분리가 필수적이다. 홍삼은 수삼을 열처리한 다음 다시 건조하여 얻은 시료인만큼, 고분자량의 단백질은 많이 발견되지 않으며, 주로 저분자량의 펩타이드가 많이 존재하리라고 추정되고 있다. 특히 이들 펩타이드성 물질중에 생리활성을 보유한 물질탐색이 현재 사포닌에만 국한된 연구에 대하여 좋은 대조를 보여주리라고 판단된다. Table 1에 나타난 바와 같이 유의성있는 항산화성을 보유한 펩타이드 분획에 대하여 분리 정제를 수행하였다. 연구초기에 펩타이드 분획의 분리를 위해서 Bio-rad P-6 column을 이용한 gel filtration과 superdex FPLC를 병행하였고, 항산화성을 보이는 분획의 정제에 superdex FPLC를 이용한 단계가 분리능이 높은 것을 확인하였지만, TLC와 NMR 분석 결과 순수분리가 아직 안 된 것으로 판명되었다. 펩타이드 계통의 분자량이 작은 물질의 분리, 특히 수용성 물질의 분리는 지용성 물질의 분리에 비하여 상대적으로 어려운 사실을 확인하였다. 그 이유로는 지용성 물질은 organic solvent를 이용한 fractionation이 쉽고, 또한 C18 column을 이용한 조건들이 확립되어 있는 반면에, 수용성 물질의 경우 분리에 필요한

column이 많이 개발되어 있지 않다는 점, 결국 분리에 한계를 갖을 수 밖에 없는 단점을 극복하기가 어려웠다. 본 실험실에는 C18 reversed-phase, Peptide RPC (C8-18) column 외에도 Superdex peptide FPLC column, Resource Q FPLC column과 같은 탁월한 column들을 보유하고 있음에도 불구하고 GMP 분리보다 더 많은 시행착오를 거듭하였다. 3차년도에 와서도 Superdex peptide, peptide RPC, Resource Q 등의 chromatography 단계를 수행함으로써 순수분리를 시도하였지만 성공적이지 못하였다. FPLC와 같은 분리능이 높은 system에서도 단일 peak로 보이는 분획을 NMR이나 Mass로 분석해보면 예외없이 contamination이 심하여 분석이 불가능한 결과만 얻었다. 많은 시행착오를 거듭한 끝에 현재 본 연구실에서 수행중인 분리 protocol은 crude extract, Superdex peptide gel filtration FPLC, Resource Q FPLC, reversed phase FPLC를 수행하는 단계를 두 번 반복하는 것이다. 펩타이드 분획에 대한 정제를 통해 다량 분리가 가능하게 되면 곧 이들 분획이 보유한 화합물에 대한 구조적 및 화학적 분석을 수행하려고 한다. 그러나 각 단계에서의 항산화성을 보유한 분획에 대한 탐색은 재현성이 높았다. 더욱이 BHT나 ascorbic acid와의 상대적인 활성 비교를 통해 유의성이 있음이 확인되고 있으며, 흥미로운 점은 Superdex FPLC 초기에 유출되는 분획에서는 ninhydrin-negative를 보이고 있으나 탄수화물 검정방법으로 각 분획을 측정할 결과 탄수화물 분획으로 사료된다 (Data not shown). 이들이 펩타이드 분획과 interaction 또는 binding 하는 가능성에 대한 연구를 통해 아마도 당펩타이드 혹은 당과 결합이 가능한 분획으로 사료되고 있다. 이들 분획의 탄수화물 연구를 수행하고 있으며 항산화성의 증감에 대한 영향에 대해서도 연구를 계획하고 있다.

## 제2절 연구결과의 활용

### (1) 학술지 및 학술대회 발표

#### 국제학술지

- 1) Belogortseva, N.I., Yoon, J.Y. and Kim, K.H. Inhibition of *Helicobacter pylori* Hemagglutination by Polysaccharide Fractions from Roots of *Panax ginseng* (1999) *Planta Medica* In press.
- 2) J.S. Ahn, Kwon, T.H., Park, H., and Kim, K.H. Purification of peptide fractions with anticomplementary activity from red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Peptide Science-present and future* (1998) 432-434.

#### 국내학술지

- 1) Kwon, T.H., Oh, S.R. and Kim, K.H. Purification of a major protein with physiological activities from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Agri. Chem and Biotech.* (1998) 41(6), 410-413.
- 2) Park, H., Kwon, T.H., and Kim, K.H. Comparison of protein patterns of the root pith from *Panax ginseng* and *panax quinquefolium*. *Korean J. Ginseng Sci.* 20(1) 49-53 (1996).

#### 대학학술지 및 프로시딩

- 1) Kang S.W. and Kim, K.H. Purification of a peptide fraction with antioxidant activities from *Panax red ginseng*. (1998) *J. Institute of Science and Technology* 6, 82-86.
- 2) Ahn, J.S., Park, H. and Kim, K.H. (1998) Purification of a peptide fraction with antioxidant activity from *Panax red ginseng*. *Advances in ginseng research.* pp360-361.
- 3) Kwon, T.H. and Kim, K.H. (1998) Purification of a major protein with physiological activities from *Panax ginseng* C.A.Meyer. *Advances in ginseng research.* pp390-391.
- 4) Kwon, T.H. and Kim, K.H. Comparison of protein patterns between *Panax ginseng* and *panax quinquefolium* using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (1997) *J. Institute of Science and Technology* 5, 93-97.

## 국제학술발표

- 1) Ahn, J.S., Park, H. and Kim, K.H. (1998) Purification of a peptide fraction with antioxidant activity from Panax red ginseng. The 7th international symposium on ginseng, Seoul, Korea.
- 2) Kwon, T.H. and Kim, K.H. (1998) Purification of a major protein with physiological activities from Panax ginseng C.A.Meyer. The 7th international symposium on ginseng, Seoul, Korea.
- 3) J.S. Ahn, H. Park and and K.H. Kim (1997) Purification of a peptide fraction with anticomplementary activity from Panax red ginseng, First International Peptide Symposium, Kyoto, Japan, Poster Presentation.
- 4) Kwon, T.H. and Kim, K.H. Purification and characterization of a major protein from the roots of Panax ginseng C.A. Meyer. Annual meeting of the Korean Society of agricultural chemistry and biotechnology (1997)
- 5) Park, H., Kwon, T.K., and Kim, K.H. Comparison of protein patterns of the root pith from Panax ginseng and Panx quinquefolium. Annual meeting of the Korean Society of Agricultural chemistry and biotechnology. poster presentation (1996)

## **(2) 산업재산권 및 산학협동 추진**

### 특허

위장질환 발병원인균의 숙주세포 결합을 저해하는 당배합체와 제조방법 (1999)  
특허출원중

### 연구발표회

당단백질의 3차구조적 분석을 이용한 고유 농산물의 고품질화 기술개발  
일시 : 1997. 8. 8.  
장소 : 고려대학교 자연과학대학 9-103

### 연구결과의 산업화

벤처 중소기업인 (주) S & D와 현재 생리활성을 보이는 산성다당류, 당펩타이드 및 GMP의 산업화의 가능성을 타진중에 있다.

## 제 4 장 참고문헌

- 1) 인삼연구보고서 (1995) 한국인삼연초연구원.
- 2) 김만옥, 최강주, 박종대, 위재준, 고성룡, 김석창 (1988) 인삼연구보고서(효능분야) 127-232.
- 3) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680.
- 4) Dunbar, B. S. (1987) Two-dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques. Plenum Press, New York.
- 5) 박훈, 권택현, 김경현 (1996) 고려인삼학회지 20(1) 49-53.
- 6) Kim, H., Chen, X, and Gillis, C.N. (1992) Biochem. Biophys. Res. Comm. 189(2), 670-676.
- 7) Gstirner, F. and Vogt, H.J. (1966) Arch. Pharm. 299, 936-944.
- 8) Okuda, H. (1978) Proc. 2nd Int. Ginseng Sym. pp75-77. Korea Ginseng Res. Inst., Seoul, Korea.
- 9) 박명환, 성현순, 이철호 (1983) 고려인삼학회지 7(2), 156-162.
- 10) 김영중, 정보섭, 이강노, 구향자, 안상미 (1983) 한국 영양학회지 16(2), 115-124.
- 11) Stocks, J., Gutteridge, J. M. C., Sharp, R. J. and Dormandy, T. L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. Clinical science and Molecular Medicine (1974) 47, 215-222.
- 12) Boven et al. (1985) Cell 41, 541.
- 13) Spitzer et al. (1990) Nuc. Acid Res. 18, 1-11.
- 14) Dubios, M., Gilles, K.A., Hamilton, I.K., Reberts, P.A., and Smith, F. (1956) Anal. Chem. 28, 350-356.
- 15) Chaplin, M. F and Kennedy, J. F. (1986) Carbohydrate analysis. IRL PRESS. pp 5-25.
- 16) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randae, R.I. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 17) Evans, D.G. and Evans, D.J. Jr. (1995) Methods Enzymol. 253, 336-360.
- 18) Ducruix, A and Giege, R. (1992) Crystallization of nucleic acids and proteins IRL Press, Oxford.
- 19) Jancarik, J. and Kim, S. H. (1991) J. Appl. Cryst. 24, 409.
- 20) Farnsworth, N.R. (1997) Proceedings of International Symposium on



the standardization and practice of herbal medicine pp3-3~3-12.

- 21) Cover, T.L. and Blasér, M.J. (1992) *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Annu. Rev. Med.* 43, 135-145.
- 22) Correa, P. (1985) Mechanisms of gastric carcinogenesis, pp109-115. In J.V. Joossens, M.J. Hill, and J. Geboers (ed.), *Diet and human carcinogenesis*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- 23) Jacob, G.S. (1995) Glycosylation inhibitors in biology and medicine. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5(5), 605-611.
- 24) Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664.
- 25) Lee, Y.C. and Lee, R.T. (1994) in *Neoglycoconjugates: preparation and applications*. Lee, Y.C. and Lee, R.T. Eds., Academic Press, San Diego.
- 26) Yarema, K.J. and Bertozzi, C.R. (1998) Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 49-61.
- 27) LaTemple, D., Henion, T.R., Anaraki, F., and Galili, U. (1996) Synthesis of  $\alpha$ -galactosyl epitope by recombinant  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase for opsonization of human cell vaccines by antigalactose. *Cancer Res.* 56, 3069-3074.
- 28) Jacob, G.S. (1995) Glycosylation inhibitors in biology and medicine. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5(5), 605-611.
- 29) Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664.
- 30) Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664.
- 31) Lee, Y.C. and Lee, R.T. (1994) in *Neoglycoconjugates: preparation and applications*. Lee, Y.C. and Lee, R.T. Eds., Academic Press, San Diego.
- 32) Yarema, K.J. and Bertozzi, C.R. (1998) Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 49-61.