

Gel filtration 에 의한 항방사선 인삼단백분획의 정제

김춘미·박경애
이화여자대학교 약학대학
(1989년 11월 6일 접수)

Further Purification of Radioprotective Ginseng Protein Fraction by Gel Filtration

Choonmi Kim and Kyung-Ae Park
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea
(Received November 6, 1989)

Abstract □ A radioprotective ginseng protein fraction was obtained from Korean white ginseng powder by the following isolation and purification procedures: Tris-HCl buffer extraction, 70% ammonium sulfate fractionation, CM-cellulose column chromatography, heat inactivation and Sephadex G-75 column chromatography. This fraction was further purified by Sepharose 4B and Sephadex G-150 column chromatographies. Three fractions obtained were subjected to Native-PAGE and SDS-PAGE using gradient gels and the silver staining method. Molecular weights of the native proteins and their subunits were estimated.

Keywords □ Radioprotective ginseng protein fraction, Sepharose 4B column chromatography, Sephadex G-150 column chromatography, native-PAGE, SDS-PAGE, gradient gel, silver staining method.

서 론

1940년대 유허화합물의 방사선 방어작용이 발견된 후, 특히 아미노티올(Aminothiols) 계통물질의 개발과 연구가 활발히 진행되어 왔다. 방어작용을 나타내는 이들 티올화합물은 방사선에 의해 생긴 free radical을 제거하여 DNA에 손상을 주지 못하게 하거나, 이미 free radical이 결합한 DNA에 수소원자를 제공하여 DNA를 회복시키는, 이른바 chemical repair에 의해 방사선에 의해 생기는 초기 손상을 감소시킨다고 한다.¹⁾ 그러나 이 과정은 전체 손상의 일부만을 방어할 뿐이므로, 이미 손상된 DNA는 biochemical repair를 거치게 되며, 이 세포내에서 일어나는 회복과정을 촉진시키는 티올화합물도 이미 발견된 바 있다.²⁾ 그러나 이들 유허화합물들은 유효하지만 동시에 유해하므로 인체에 해독을 끼치지 않는 방사선 방어물질의 개발이 중요

한 과제가 되고 있다. 더욱이 핵시대가 현실화됨에 따라 핵사고에 대비하여야 하고, 암환자의 방사선치료에서 정상세포를 보호하여 방사선을 더욱 유용하고 안전하게 사용할 수 있어야 하겠으며, 군사적 목적이나 실험적 사용에 따르는 위험도 방지하여야 하므로, 방사선 방어물질의 개발 필요성은 날로 증대되고 있다.

최근, 수천년 동안 사용되어 온 인삼에 방사선 방어작용이 있다는 보고가 있었고,^{3,4)} 또 그 활성성분이 단백질일 가능성이 제시되었다.⁵⁾ 티올화합물이 방사선의 일차적인 목표인 DNA 분자에 작용하여 손상을 방지하거나 또는 회복을 촉진시킴으로써 그 작용을 나타낸다는 작용기전에 근거하여, 방사선 방어작용이 있는 인삼성분도 DNA 분자에 영향을 주어 그 작용을 나타낼 가능성이 클 것으로 가정되었다. 따라서 본 실험실에서는 인삼으로부터 단백질분획을 부분 정제하여⁶⁾ γ -ray를 조사한 마우스에 투여

함으로써 45%의 생존율을 얻어 이 성분의 방어작용을 확인하였으며,⁷⁾ 이 활성성분이 방사선이나 화학적 돌연변이원에 의해 유발되는 DNA의 손상에 어떤 영향을 미치는가를 밝히기 위해 자매염색체 교환(sister chromatid exchange, SCE)과 염색체 이상(chromosome aberration, CA)에 대한 효과를 연구하였다. 즉 배양 중인 Chinese hamster ovary(CHO-K1) 세포에 자외선을 조사하거나, X-ray와 비슷한 효과를 내는 것으로 보고된 methyl methanesulfonate(MMS)를 처리하여 높은 빈도의 SCE와 CA를 유발시킨 후, 인삼의 활성성분을 가한 결과 SCE와 CA가 현저히 감소함을 발견하였다.⁸⁻¹¹⁾ SCE나 CA는 DNA상의 손상이 잘못 수정되거나 또는 전혀 회복되지 않은 채 남아있을 때 생긴다고 한다.¹²⁾ 따라서 SCE와 CA의 감소는 SCE나 CA의 생성과 연계되는 DNA손상의 감소를 의미하며, 이는 인삼의 활성성분이 DNA분자에 영향을 주어, 자외선이나 MMS에 의한 초기 손상을 감소시켜 repair되어야 할 손상의 양을 줄이거나, 이미 손상된 DNA의 회복능력을 증가시킴으로써 나타난 결과일 것으로 해석되었다.

이와 같이 DNA분자에 작용하여 방사선이나 알킬화제인 MMS로부터 세포를 보호할 수 있는 인삼 성분은 방사선에 의한 손상 뿐 아니라 환경적 돌연변이원으로부터도 우리 생체를 보호해 줄 가능성이 크므로 매우 중요한 의미를 갖는다. 따라서 본 연구에서는 이 성분을 순수 분리하여 그 구조를 결정하려는 목적으로 γ -ray를 조사한 마우스에서 방사선 방어작용을 나타낸 단백분획을 Sepharose 4B column과 Sephadex G-150 column chromatography에 의해 한 단계 더 정제하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

인삼은 6년근 백삼을 사용하였고, CM-cellulose, Sephadex G-75, silver nitrate 및 giutardialdehyde는 Sigma Co. 제품을 사용하였다. 또 High molecular weight(HMW) calibration kit, PhastGel Gradient 8-25(pH 6.4),

PhastGel Gradient 10-15(pH 6.4), PhastGel Native Buffer Strip(pH 8.8), PhastGel SDS Buffer Strip(pH 8.5), sodium dodecyl sulfate(SDS), β -mercaptoethanol 및 Sepharose 4B는 Pharmacia Fine Chemicals 제품을, 그리고 bromphenol blue(BPB)는 Merck Co. 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

추출 및 염색: 인삼분말을 0.05 M-Tris HCl buffer(pH 7.6)에서 24시간 동안 추출하여 상등액을 취하고, 여기에 황산암모니움을 가하여 70%까지 포화시키 그 침전을 취하였다.

CM-cellulose 칼럼 크로마토그래피: 이 침전을 물에 녹여 투석한 후 농축시켜 CM-cellulose 칼럼에 주입하고 먼저 0.02 M-KH₂PO₄ 용액(pH 5.8) 약 600 ml/을 170 ml/hr의 유속으로 유출시켰으며, 매 20 ml/ 분획단위로 취하였다(A분획). 그 후 유출용매를 0.05 M-인산완충액(pH 7.4)으로 바꾸어 같은 방법으로 유출시켜 결합분획을 얻었다(B분획).

열 처리: 위의 두 분획 중 방사선 방어작용을 나타내는 B분획^{5,6)}을 0.5 N-NaOH 용액으로 중화시킨 후 비등수욕상에서 15분간 가열하여 열에 불안정한 물질을 침전으로 제거하였다.

Sephadex G-75 칼럼 크로마토그래피: 열에 안정한 상등액을 농축시켜 칼럼에 주입하고 0.05 M-인산완충액(pH 7.2)을 15 ml/hr로 유출시켜 매 5 ml/ 분획단위로 취하였다.

Sepharose 4B 칼럼 크로마토그래피: 위에서 얻은 두 개의 분획 중 γ -ray를 조사한 마우스에서 45%의 생존율을 나타낸⁷⁾ GI분획을 칼럼에 주입하고 0.05 M-인산완충액(pH 7.2)을 6 ml/hr로 유출시키면서 2 ml/씩 취하였다. 각 정제단계에서의 단백질 함량을 Lowry 법으로 정량하였다.

Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

(Native-PAGE): Sepharose 4B 칼럼에서 유출된 세 분획(SI, SII 및 SIII)을 40 μ g/ml이 되게 sample buffer(pH 8.0)에 녹이고 SII는 다시 10배 희석하였다. 이들 시료와 표준단백질 2 μ l를 주입하고 PhastGel Gradient 8-25를 사용하여

PhastGel Native Buffer System에서 10 mA 로 268 Vh 동안 전개하였다. Heukeshoven 과 Der-nick 의 방법¹³⁾에 의해 silver staining 을 실시하였 다.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) : Native-PAGE 에서와 마찬가지로 세 분획과 표준단백질을 sample buffer (pH 8.0)에 녹이고 여기에 SDS (최종농도 2.5%)와 β -mercaptoethanol (최종농도 5.0%)을 가하여 100°C에서 5분간 가열하였다. 이들 시료 2 μ l 를 주입하고 PhastGel Gradient 10-15를 사용하여 PhastGel SDS Buffer System에서 10 mA 로 60 Vh 동안 전개하였다. Silver staining에 의해 band를 확인 하였다.

Sephadex G-150 칼럼 크로마토그래피 : GI 분획을 칼럼에 주입하고 0.05 M-인산완충액 (pH 7.2)을 8 ml/hr의 유속으로 유출시키면서 4 ml 씩 취하였다.

결과 및 고찰

인삼분말에서 추출되어 70% 황산암모늄 염색을 거쳐 얻어진 성분은 CM-cellulose 칼럼 크로마토그래피에서 두 개의 peak을 나타내었다 (Fig. 1). 여기서 A 분획은 Lieberman-Burchard 반응에 양성을 나타내어 사포닌 함유분획이었고 B 분획은 이 반응에 음성, Biuret test에 양성이며 UV 280 nm에서 흡수극대를 보이는 단백질 함유분획이었다. 이 두 분획에 대해 X-ray를 조사한 마우스에서 방사선 방어작용을 검사한 결과,^{5,6)} B 분획이 강한 방어작용을 나타내어 이 분획으로 다음 단계의 정제과정을 시행하였다.

Sephadex G-75 칼럼에서는 두 분획 (GI 과 GII)을 얻었으며 (Fig. 2), 이 두 분획을 γ -ray를 조사한 마우스에 투여한 결과 GI 분획이 30일 생존율을 현저히 증가시켜 강한 방어작용을 나타내었다.¹⁷⁾ 이 분획은 UV와 MMS에 의해 유도된 자매염색분체 교환과 염색체이상을 현저히 감소시켜, DNA 분자에 영향을 줌으로써 그 작용을 나타냄이 밝혀졌으며, 방사선이나 화학적 돌연변이원에 의해 생기는

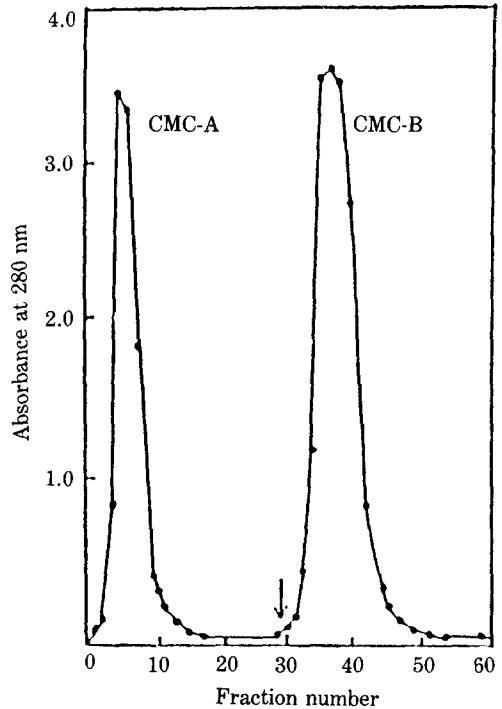


Fig. 1. CM-Cellulose ion exchange column chromatography of the ginseng extract.

The column was first eluted with 0.02 M KH_2PO_4 and then with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) from the point of arrow. Each fraction of 20 ml was collected at a flow rate of 170 ml/hr.

DNA 분자의 초기 손상을 감소시키거나, 이미 생성된 손상의 회복을 촉진시키는 복합적인 기전에 의해 작용할 것으로 가정되었다.

이 활성분획 GI을 Sepharose 4B 칼럼에서 분리한 결과 세 개의 peak이 나타나 (Fig. 3), 활성분획인 GI은 최소한 세 가지 단백질의 혼합물임을 알 수 있었다. 이 결과는 GI 분획에 대한 TLC,¹⁴⁾ PAGE¹⁵⁾ 및 HPLC¹⁴⁾의 결과와 일치하는 것이었다. 각 정제단계에서 회수된 단백질의 양과 회수율은 Table 1과 같다. 이 세 분획 (SI, SII 및 SIII)에 대해 Native-PAGE를 실시한 결과 (Fig. 4), SI에서는 1개, SII에서는 2개 그리고 SIII에서는 2개의 band가 나타났으며, 같은 위치에서 나타나는 SII-B와 SIII-B를 양 분획에 걸쳐 유출된 같은 성분으로 간주한다 하더라도 GI 분획은 네 가지 단백질을 함유하는 것으로 추정되었다. SDS-PAGE를

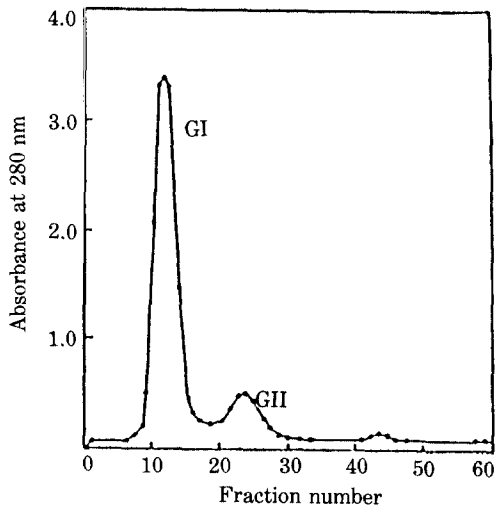


Fig. 2. Sephadex G-75 column chromatography of CMC-B fraction.

The column was eluted with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2). Each fraction of 5 ml was collected at a flow rate of 15 ml/hr.

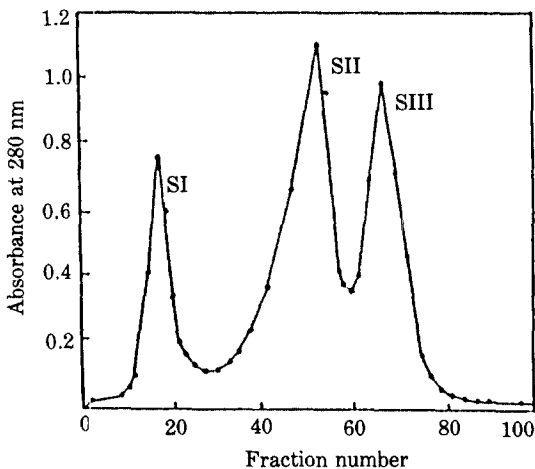


Fig. 3. Sephacrose 4B column chromatography of GI fraction.

The column was eluted with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2). Each fraction of 2 ml was collected at a flow rate of 6 ml/hr.

실시한 결과는 Fig. 5와 같다. SI에서는 2개, SII에서는 3개 그리고 SIII에서는 2개의 subunit band가 관찰되었다. Native protein과 subunit의 분자량은 대략 Table 2와 같다. SI은 단일성분으로 나타났으므로 두 가지 subunit으로 구성되어

Table 1. Relative yields of the protein purified from ginseng crude extract

Purification step	Total* protein (mg)	Relative yield (%)
Crude extract	7521.22	100.00
70% (NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	4258.10	56.61
CM-Cellulose chromatography		
CMC-A	1056.42	14.05
CMC-B	1135.21	15.09
Heat inactivation of CMC-B	1048.40	13.94
Sephadex G-75 chromatography		
GI	121.77	1.62
GII	12.60	0.17
Sephacrose 4B chromatography		
SI	0.21	<0.01
SII	3.01	0.04
SIII	0.56	0.01

*The amounts of protein given here were obtained from 150g of ginseng powder

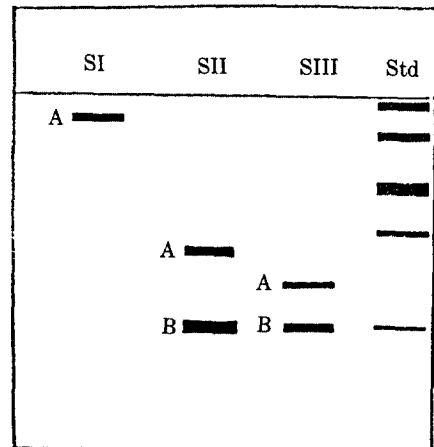


Fig. 4. Native-Polyacrylamide gel electrophoresis of Sephacrose 4B fraction.

Standard proteins were thyroglobulin, ferritin, catalase, lactate dehydrogenase and albumin, from top to bottom. Electrophoresis was carried out using PhastGel Gradient 8-25 at the current of 10 mA for 268 Vh. Silver staining technique was used for the development of the gel.

있는 단백질이라고 할 수 있겠으나 SII와 SIII는 각각 2개의 band로 나타나, 각 subunit band가 native protein의 어느 것에서 유래된 것인가를 확

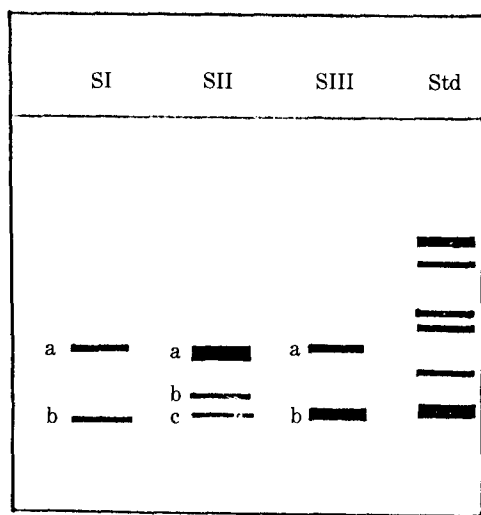


Fig. 5. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of Sepharose 4B fraction.

Standard proteins were thyroglobulin, ferritin (half unit), albumin, catalase, lactate dehydrogenase and ferritin, from top to bottom. Electrophoresis was carried out using PhastGel Gradient 10-15 at the current of 10 mA for 60 Vh. Silver staining technique was used for the development of the gel.

Table 2. Molecular weight of native proteins and their subunits obtained from Sepharose 4B column chromatography

Native-PAGE	M.W.	SDS-PAGE	M.W.
SI-A	510,000	SI-a	45,000
		-b	15,000
SII-A	120,000	SII-a	42,000
-B	57,000	-b	25,000
		-c	18,000
SIII-A	90,000	SIII-a	46,000
-B	58,000	-b	18,500

인할 수는 없었다.

Sepharose 4B 칼럼 크로마토그래피에서 얻은 세분획이 Native-PAGE 에서 적어도 네 가지의 단백질을 함유하고 있는 것으로 나타나, 이들을 각각 분리할 목적으로 Sephadex G-150 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 그러나 이 칼럼에서도 역시 3개의 peak 이 나타나(Fig. 6), 네번째 성분의 존재 유

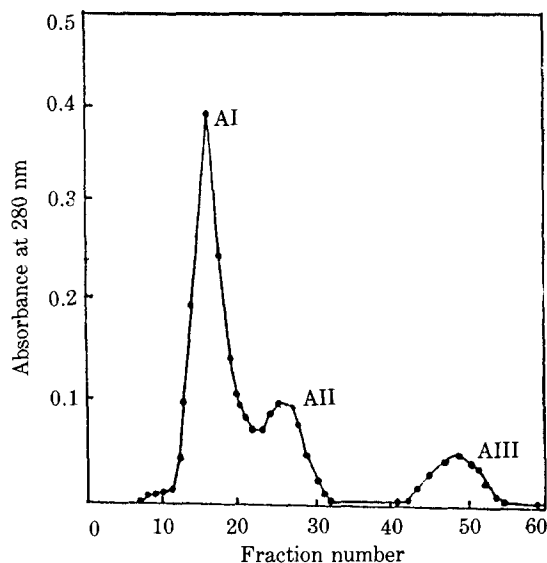


Fig. 6. Sephadex G-150 column chromatography of GI fraction.

The column was eluted with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2). Each fraction of 4 ml was collected at a flow rate of 12 ml/hr.

무와 존재하는 경우의 분리는 gel filtration 이 아닌, gel electrophoresis 와 같은 다른 방법으로 시도되어야 할 것으로 생각된다.

Sepharose 4B 칼럼에서 회수된 단백질 양이 극소하여 동물을 사용하는 활성검사는 시행할 수 없었으며, 자외선을 조사한 배양세포(CHO-K1)의 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 그러나 세포의 생존율과 방사선 방어작용 사이에 정확한 상관관계가 성립되지 않았으며, 이는 DNA 에 생기는 손상이 흔히 세포를 치사시키기 보다는 세포에 변이를 주는 종류의 것인 경우가 많고, 또 DNA 상의 손상에 의해 생기는 생물학적 결과를 변화시킬 수 있는, 다른 생화학적 과정이 세포의 생존율에 영향을 주기 때문이라고 생각된다.¹⁶⁾

따라서 본 연구실에서는 세포수준의 방어작용 검사법을 개발하고 방어작용이 있는 순수성분을 얻어 그 구조를 규명하기 위한 연구를 계속하고 있다.

요 약

한국 백삼분말로부터 Tris-HCl buffer 추출, 황산암모늄 염석, CM-cellulose 칼럼 크로마토그

라피, 열처리 및 Sephadex G-75 칼럼 크로마토그라피에 의해 얻은 방사선 방어작용이 있는 단백분획을 Sepharose 4B 칼럼과 Sephadex G-150 칼럼 크로마토그라피에 의해 더욱 정제하여 세 분획을 얻었다. 이들 분획에 대해 gradient gel 을 사용한 Native-PAGE 와 SDS-PAGE 를 시행하였으며, native protein 들과 subunit 들에 대해 분자량이 추정되었다.

인용문헌

- Held, K.D.: *Pharmac. Ther.*, **39**, 123 (1988).
- Riklis, E., Kol, R., Green, M., Prager, A., Marko, R. and Mintsberg, M.: *Pharmac. Ther.*, **39**, 311 (1988).
- Yonezawa, M.: *J. Radiat. Res.*, **17**, 111 (1976).
- Chang, Y.S., Park, C.I. and Noh, H.I.: *Proc. 3rd Int. Ginseng Symp.*, p. 197 (1980).
- Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.: *Proc. 3rd Int. Ginseng Symp.*, p. 17 (1980).
- Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.: *J. Radiat. Res.*, **22**, 336 (1981).
- Kim, C.M. and Han, G.S.: *Yakhak Hoeji*, **29**, 246 (1985).
- Kim, C.M. and Choi, J.E.: *Arch. Pharm. Res.*, **11**, 93 (1988).
- Kim, C.M. and Park, S.Y.: *Arch. Pharm. Res.*, **11**, 225 (1988).
- Kim, C.M. and Yoon, S.R.: *Yakhak Hoeji*, **32**, 313 (1988).
- Kim, C.M. and Park, H.S.: *Korean Biochem. J.*, **21**, 525 (1988).
- Reynolds, R.J., Natarajan, A.T. and Lohman, P.H.M.: *Mutation Res.*, **64**, 353 (1979).
- Heukeshoven, J. and Dernick, R.: *Electrophoresis*, **6**, 103 (1985).
- Kim, C.M. and Kim, H.L.: *Arch. Pharm. Res.*, **9**, 5 (1986).
- Kim, C.M. and Hwang, J.J.: *Yakhak Hoeji*, **30**, 343 (1986).
- Murry, D., Vanakeren, S.C., Milas, L. and Meyn, R.E.: *Pharmac. Ther.*, **39**, 151 (1988).