

Capsaicin 가수분해효소의 흰쥐 간세포내 소재확인

박영호 · 이상섭*

서울대학교 약학대학 생화학실

(Received November 23, 1993)

Subcellular Localization of Capsaicin-Hydrolyzing Enzyme in Rat Hepatocytes

Young Ho Park and Sang Sup Lee*

College of Pharmacy, Seoul National University San 56-1, Shillim-Dong, Kwanak-Gu, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Capsaicin(8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is the principal pungent component of *Capsicum* fruits. This work is directed to the capsaicin-hydrolyzing enzyme playing a key role in the rate limiting and critical step of capsaicin metabolism. In order to get precise information on the enzyme's subcellular location, rat liver homogenate was divided into six subcellular fractions by differential centrifugation technique: crude nuclear pellet, PNS(post nuclear supernatant) fraction, lysosomal pellet, cytosol, Tris wash fraction, micrisomes. Capsaicin-hydrolyzing enzyme activity was analysed by high performance liquid chromatography(HPLC). This enzyme was found at the highest specific activity in the microsomal fraction and co-distributed with marker enzymes of the endoplasmic reticulum, NADPH-cytochrome c reductase and nucleoside diphosphatase. This is compatible with the result of ninhydrin color reaction of vanillylamine, primary metabolite of capsaicin hydrolysis, on thin layer chromatography(TLC). This enzyme is most active at pH 8.0~9.0. Definite subcellular location of this enzyme will make it easy to proceed with further study.

Keywords □ Capsaicin-hydrolyzing enzyme, marker enzyme assay, endoplasmic reticulum, rat hepatocyte.

Capsaicin은 고추(*Capsicum annum L.*)의 주요한 매운 성분이다. 고추는 기호 향신료로서 일반 조미료일 뿐만 아니라 김치, 고추장 등 우리 민족 고유의 발효식품에도 사용되어 왔다. 한편 고추는 그 다양하고 독특한 자극성으로 인해 옛날부터 향신료, 방부제, 민간약 등에 널리 사용되어 왔는데, 1940년 후반 Jancso 등은 capsaicin을 국소 또는 전신 투여하였을 때 처음에는 강한 자극성을 나타내나 곧이어 다른 화학적 자극에 대해 지속적으로 무감각하게 한다는 보고를 하였다.¹⁾ 또한 capsaicin은 위액분비를 촉진하며,²⁾ 심혈관계에 작용하여³⁾ 혈압을 떨어뜨리고, 심장박동을 변화시키며, 호흡을 곤란하게 하고, 체온 조절기능을 손상시켜 체온을 떨어뜨리는 작용도⁴⁾ 있

음이 보고되었다. 이러한 capsaicin의 작용중에서도 가장 흥미로운 것은 진통효과이며, 이는 capsaicin이 통증 전달에 관여하는 신경을 처음에는 자극하나 뒤 이어 감각상실을 일으키는데 기인한다고 보고되었다.⁵⁾ 이러한 자극성을 이용해 capsaicin은 신미성 건위제, 찜질용 소염제, 발포제 등에서 사용되고, 근년에 들어서 지속성 진통작용을 가지는 비스테로이드성 소염진통제(NSAIDs) 개발과 관련해 또한 구심성 감각신경을 통한 진통기전 연구의 중요한 물질로서 크게 주목을 받고있다. 이 물질의 생체내 대사에 관한 연구는 미진했는데 Lee 등에 의해 capsaicin의 방향환 수산화,⁶⁾ ω -hydroxylation을 거치는 대사경로가⁷⁾ 밝혀졌다. 또한 Kawada 등에^{8,9)} 의해 Fig. 1에 보인바와 같은 capsaicin의 주된 대사경로가 밝혀졌는데, 이때

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

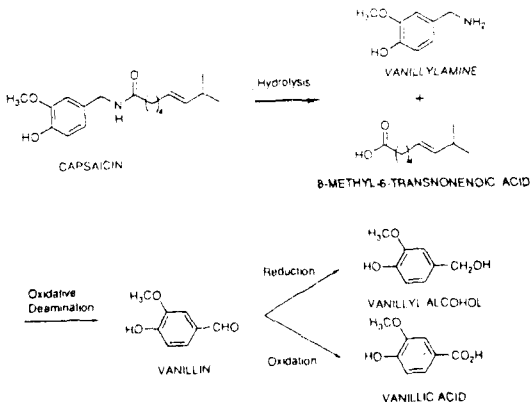
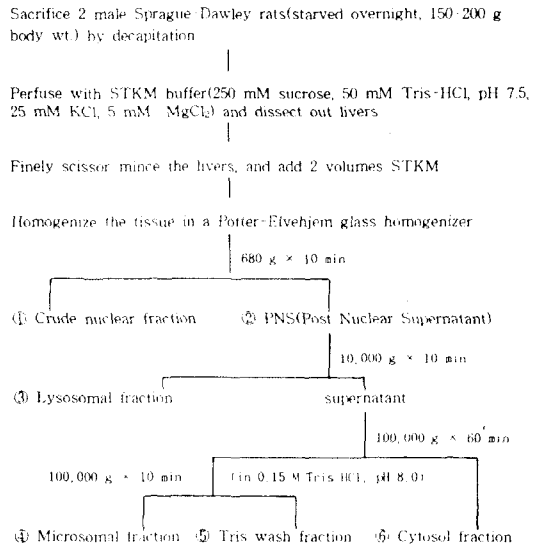


Fig. 1—Metabolic pathway of capsaicin in rats.

capsaicin과 각 대사물은 대부분 glucuronide에 의해 포함되는 제 2상 반응을 거쳐 노로 배설된다. 그런데 이 대사과정 중 가수분해과정이 capsaicin의 대사과정에서 첫단계로서 가장 중요할 뿐만 아니라 효소 반응속도론적으로 볼 때에도 속도결정단계로서¹⁰⁾ 가장 중요하다고 판단되었으므로 이 반응에 관여하는 capsaicin 가수분해효소에 관한 연구를 시작하게 되었다. 특히 이 효소는 capsaicin의 연속 경구투여에 의해 induction될 수 있다고 한다.¹⁰⁾ 고추의 과량흡수¹¹⁾ 인한 독물학적 필요성, 진통기전 연구재료로서의 작용검증과 관련한 필요성에서 뿐만 아니라, 근년의 capsaicin 유사체를 이용한 새로운 기전의 비마약성 소염진통제 개발과 관련하여 경구용 약제개발¹²⁾ 등 약제학적 측면에서도 capsaicin의 대사과정 검토가 중요하게 되었다. Trypsin, protease(bacterial & fungal protease), peptidase, aminoacylase 등 다양한 산아미드결합에 대한 가수분해력을 지닌 효소들에 의해서 capsaicin의 산아미드결합이 깨어지지 않음이 보고된 바¹⁰⁾ 있는데 그 가수분해기전 등 효소자체에 대한 연구도 의미있다고 하겠다. 이상의 필요에 의해서 capsaicin의 대사과정을 연구하게 되었는데 우선 이 효소의 세포내 소재를 밝히는 것이 이후의 연구를 위해서 필수적이라 할 수 있다.

실험방법

실험동물—실험에 사용한 Sprague-Dawley(SD) male rat는 서울대학교 실험동물사육장으로부터 공



Scheme 1—Preparation and subfractionation of rat liver homogenates.

급받아 최소 2주간 사육장 환경에 적응시킨 후 사용했다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육실 내의 온도는 20°C 내외, 습도는 50~60%, 조명은 12 시간 명/암 주기가 되도록 조절하였다.

시약 및 기기—Capsaicin, vanillylamine과 표지효소활성 측정용으로 사용된 NADH, NADPH, sodium inosine diphosphate, cytochrome c, 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside, Triton X-100, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. 단백질 정량에는 Bio-Rad Dye Reagent를 사용했다. 기타의 시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

원심분리기는 Beckman(U.S.A)사의 model L-80, spectrophotometer는 Shimadzu(Japan)사의 model UV-2100, 형광광도계는 Perkin-Elmer(U.S.A)사의 model FP-777, HPLC system은 Shimadzu(Japan)사의 model LC-9A을 사용하였다.

단백질 정량—BSA(bovine serum albumin)를 표준으로 하여 Coomassie blue dye staining method¹³⁾ 의해 측정하였다.

흰쥐의 간조직 분리과 분획 원심분리법에 의한 간조직미생물의 분획화¹⁴⁾—Scheme 1의 순서에 따라 ①~⑥의 각 분획을 얻었는데 PNS(post nuclear su-

pernatant) fraction은 조핵분획(crude nuclear fraction)을 얻은 이후의 분리과정에서의 효소原이 되며 각 분획에서의 세포내소기관의 활성을 비교 측정하는 기준이 되었다. 조핵분획, 리소솜 분획, 마이크로솜 분획은 간 무게의 1.5~2배 부피의 S-TKM buffer (250 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂)에 현탁시켰고 6종의 각 분획은 실험할 때까지 -70°C의 냉장고에 보관했다. 분리과정중 모든 조작은 4°C에서 행해졌다. 이상에서 얻은 6 분획에서의 표지효소활성의 패턴과 capsaicin 가수분해효소의 활성을 비교했다.

TLC에 의한 효소활성 측정—각 분획 1 ml에 0.1% Tween 80에 현탁된 6 mM의 capsaicin을 1 ml 가해 결국 Tween 80이 0.05%, capsaicin이 3 mM이 되도록 했다. 이를 37°C에서 3시간 동안 교반하면서 incubation했다. 여기에 CHCl₃-CH₃OH(2 : 1, v/v) 2 ml를 가해 추출해서 유층만 분리했다. N₂ gas로 추출용매를 날려 보내고 잔사체를 얻은 후 100 μl의 추출용매로 잔사체를 녹이고 TLC plate에 일정량씩 spotting했다. 전개용매로 미리 포화된 전개조에서 약 2시간동안 전개시켰다. 전개용매로는 n-butanol : HOAc, glacial : H₂O (40 : 10 : 50, v/v)의 상층을 사용했다. 전개된 plate를 drier로 말린 후, 바로 제조된 0.25% ninhydrin(in acetone)을 붓고 oven에 약 5분 구워 발색시켰다. 이때 vanillylamine은 특징적인 yellow spot를 나타내었다.

HPLC에 의한 효소활성 측정—조핵분획과 PNS 분획의 경우 50 μl, 다른 분획의 경우 150 μl를 취하고 여기에 S-TKM buffer를 가해 모두 0.5 ml의 용량이 되게 했다. 0.5 mM의 capsaicin(in 0.1 % Tween, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2) 0.5 ml를 희석된 각 분획에 가해 이를 37°C에서 130분 동안 교반하면서 incubation했다. 여기에 6 N HCl 0.1 ml를 가해 반응을 중지시키고 10,000 g에서 10분 동안 원심분리해 변성된 단백질을 제거했다. Incubation전에 반응 혼합액에 6 N HCl 0.1 ml를 가한 것을 blank로 해서 비교했다. Reaction mixture에서 반응 후 남아 있는 capsaicin의 양을 HPLC system(Shimadzu, Japan)에 의해 정량했다. 이때 UV/visible absorbance detector를 이용해 280 nm에서 capsaicin을 측정했다. Capsaicin 분리를 위한 이동상으로는 methanol-water

(75 : 25, v/v)를 사용했다. Merck RP-18(25 cm×4 mm) column을 썼고 유속은 상온에서 0.5 ml/분으로 유지했다.

표지효소활성 측정—분획 원심분리법에¹⁴⁾ 의해 얻어진 각 분획에는 특정 세포내소기관이 상대적으로 다량 분포하지만 異種의 소기관들도 섞여 있다. 그러므로 세포질에 대해선 lactate dehydrogenase,¹⁵⁾ 미토콘드리아에 대해선 succinate-cytochrome c reductase,¹⁶⁾ 리소솜에 대해선 β-hexoaminidase,¹⁵⁾ 소포체의 cytosol surface marker로 NADPH-cytochrome c reductase,¹⁷⁾ 소포체의 luminal surface marker로 nucleoside diphosphatase¹⁸⁾ 등을 각 세포내소기관에 대한 표지효소로 채택하고 각 분획에서 각각의 활성을 측정했다.

Lactate dehydrogenase의 activity는 NADH의 340 nm에서의 흡광도 감소를 spectrophotometer를 이용해 측정했다. Succinate-cytochrome c reductase의 activity는 cytochrome c의 환원으로 인한 552 nm에서의 흡광도 증가를 측정하였다. β-hexoaminidase의 activity는 기질의 decomposition 후 excitation wavelength 364 nm, emission wavelength 448 nm에서 형광도를 측정하였다. NADPH-cytochrome c reductase의 activity는 cytochrome c의 환원으로 인한 552 nm에서의 흡광도 증가를 측정하였다. Nucleoside diphosphatase는 IDP(inosine diphosphate)를 기질로 사용했고 유리된 phosphate는 Baginski 등의 방법을¹⁹⁾ 따라 측정함으로써 그 activity를 구할 수 있었다.

효소활성의 pH 의존성—Microsome 분획에 citrate phosphate buffer, phosphate buffer, carbonate buffer를 가해 여러 pH 범위에서 효소활성을 측정했다.

실험결과

TLC에 의한 각 분획에서의 capsaicin 가수분해효소의 활성 검색—Fig. 1에서 보인바와 같이 capsaicin은 여러 단계의 대사과정을 거치는데, 가수분해반응에 의한 첫번째 대사물인 vanillylamine을 ninhydrin 발색반응시켜 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이때 vanillylamine은 특징적인 노란 빛을 나타내었다. Vanillylamine 아래 위에 붉게 발색된 물질은, capsaicin을 가하지 않고 효소원만을 incubation시켜 ninhydrin

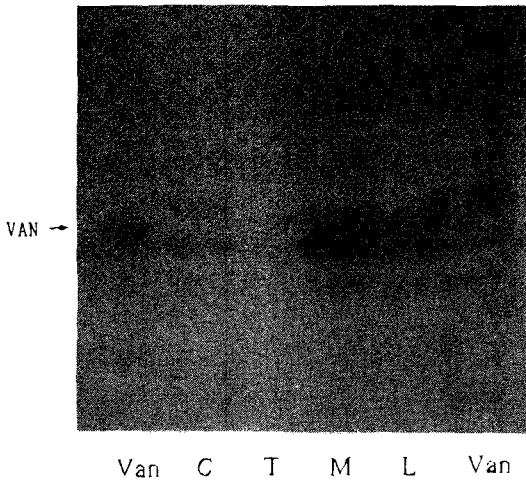


Fig. 2--A TLC of capsaicin metabolites with subfractionated cell extracts of rat liver.

Solvent system; n-butanol : acetic acid : H₂O (40 : 10 : 50 v/v, upper phase); Color reaction: 0.25% ninhydrin in acetone.; VAN: vanillylamine, L: lysosomal pellet, C: cytosol fraction, M: microsome, T: Tris wash fraction. Vanillylamine shown on right side shifted upward.

발색시킨 대조군 실험을 통해, 효소원에서 유래한 amine기를 가진 물질임을 알 수 있었다. 이 결과를 보고 우선 다른 분획에 비해 마이크로솜 분획에서 capsaicin 가수분해효소의 활성이 강하게 나타남을 알 수 있었다. Fig. 2의 결과는 capsaicin 가수분해효소가 소포체에 존재함을 강력히 시사하지만 이 효소 활성을 정량화 할 수는 없었기 때문에 이 효소가 소포체에만 존재함을 확실히 증명할 수는 없었다.

HPLC를 이용한 capsaicin 가수분해효소 활성의 검색—Capsaicin은 vanillylamine을 거쳐 계속 대사 과정이 진행되므로 가수분해효소 활성의 측정에서 vanillylamine을 목표로 한 측정방법에 문제가 있다고 보아질 수도 있으나 *in vitro* 조건에서 기질인 capsaicin을 과량 가했으므로 각 분획에서 효소활성의 양상을 비교해 보는 데는 별 무리가 없었다고 판단된다. 하지만 이 효소의 세포내 존재위치를 확실히 증명하기 위해선 각 분획에 capsaicin을 가하고 반응시킨 후 감소된 capsaicin의 양을 HPLC로 측정하는 것이 최선의 방법이다. Fig. 3에 보인 바와 같이 blank에 비

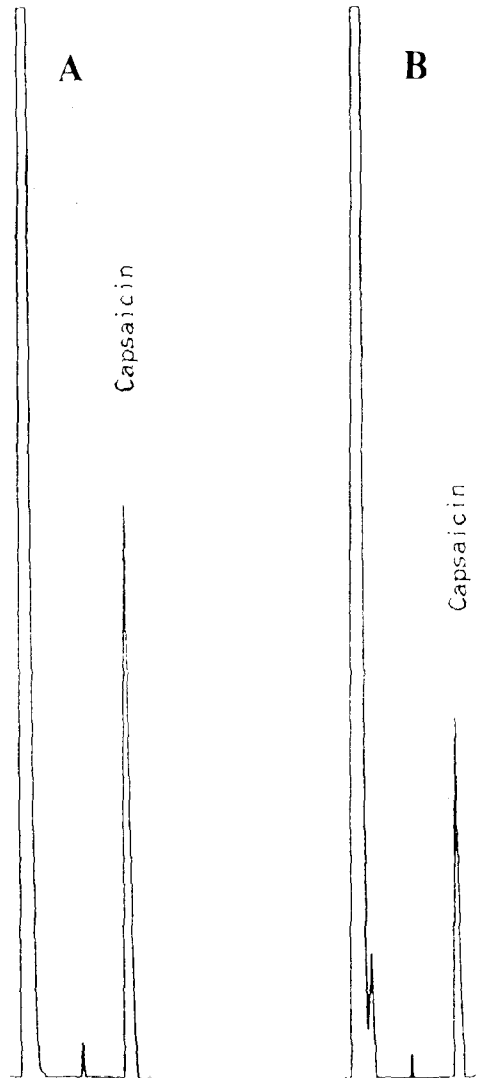


Fig. 3—A HPLC of the remaining capsaicin after enzyme treatment.

(A) blank; (B) reaction mixture. Analysis was carried out by HPLC system as follows: mobile phase, methanol-water(75 : 25 v/v); column, RP-18T(Merck Co.) 25 cm×4 mm, at room temperature (15~20°C); flow rate, 0.5 mL/min.

Table I—Comparison of marker enzyme activity with capsaicin-hydrolyzing enzyme activity

Fraction	Protein(mg) ¹⁾	Proportion (% of PNS value)					
		LDH	SDH	HA	NCCR	NDPase	CAP-Hydro. Enz. Act.(munit)
cNP	76.4(840.0)	15.7	—	—	67.2	67.5	72.2(363.1)
Lysosomal pellet	28.9(317.8)	3.78	56.7	73.4	21.0	13.0	19.5(98.2)
Cytosol	37.7(414.8)	93.3	2.58	5.80	10.1	15.5	13.7(69.09)
Tris Wash	0.0393(0.432)	2.21	0.211	0.350	3.99	4.20	—
Microsomes	30.3(332.8)	1.09	2.21	10.1	57.7	72.0	62.3(313.4)

Fractions are obtained as outlined in Scheme I. Results are means for three separate experiments. The marker enzymes used are: LDH, lactate dehydrogenase(cytosol); SDH, succinate dehydrogenase(mitochondria); HA, β -hexoaminidase(lysosome); NCCR, NADPH cytochrome c reductase(ER); NDPase, nucleoside diphosphatase(ER). Capsaicin-hydrolyzing enzyme activity is expressed with munits. One unit hydrolyzes 1 μ mol of capsaicin per gram of liver per hour.

¹⁾: Total mg protein per 14 g liver

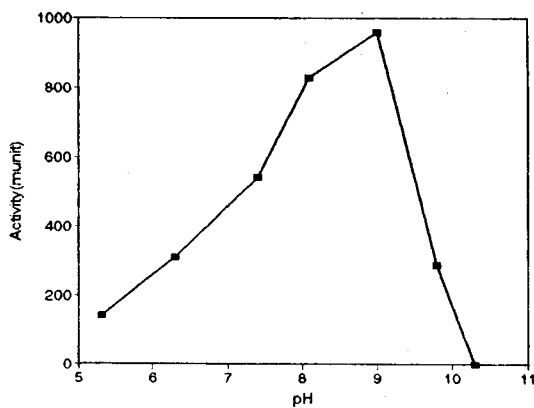


Fig. 4—pH-Dependency of capsaicin-hydrolyzing enzyme activity.

For the range of pH 5.3~7.4, citrate-phosphate buffer was used. Phosphate buffer was used at pH 8. Above pH 9.0 carbonate buffer was used. Capsaicin-hydrolyzing enzyme activity is expressed with munits. One unit hydrolyzes 1 μ mol of capsaicin per gram of liver per hour.

해서 효소작용에 의해 감소된 capsaicin의 양을 측정할 수 있었는데 이 조건에서 vanillylamine 등 다른 대사물은 검출되지 않았다.

각 분획에서의 표지효소활성과 capsaicin 가수분해 효소 활성의 비교—각 분획에 대해 5종의 세포내소기관 표지효소활성을 측정하고 이 결과와 HPLC로 정량해서 얻은 capsaicin 가수분해효소의 각 분획에서의 분포 양상을 비교한 결과, 이 효소가 소포체의

표지효소인 NCCR (NADPH-cytochrome c reductase)와 NDPase (nucleoside diphosphatase)의 각 분획에서의 분포패턴과 일치해 소포체에만 존재하는 효소임을 증명할 수 있었다(Table 1).

Capsaicin 가수분해효소 활성의 pH 의존성—TLC에 의한 결과(data not shown)와 HPLC에 의한 결과 양쪽 모두에서 이 효소가 pH 8~9 범위의 약알칼리성에서 최대활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 4). 이를 보아도 이 효소가 pH 4.8 정도의 산성 조건인 리소솜에 존재하는 가수분해효소가 아님을 간접적으로 알 수 있다. 여기서 3종의 buffer를 사용했으므로 ionic strength 등 buffer 자체의 차이로 인한 효소 활성 변화도 생각해 볼 수 있으나 다른 종류의 buffer로 실험했을 때도 일관된 결과를 얻었다.

고찰 및 결론

태국의 농촌지역 주민들의 경우 식사량 100 g 당 약 14 mg의 capsaicin이 포함되어있다는 보고가¹¹⁾ 있는 바와 같이, 향신료로서 광범한 지역에서 고추를 사용함으로써, 그 주된 매운성분으로 다양한 생리활성을 가진 capsaicin을 상당량 섭취하고 있으므로 독물학적 견지에서 그 대사과정의 연구가 필요하다고 할 수 있는데, 최근 Oi 등에¹⁰⁾ 의해서 capsaicin의 연속경구투여에 의해 capsaicin 가수분해효소가 induction될 수 있음이 밝혀졌다. 이는 약물대사에 관여하는 어떤 nonmicrosomal enzyme도 induction되지

않는다는 보고와²⁰⁾ 본 연구에서의 capsaicin 가수분해효소가 소포체에 위치하고 있다는 사실이 일치함을 나타내준다.

진통기전을 위시한 여러 생리기전 연구에서도 capsaicin은 유용한 실험재료로 사용되는데 이때 *in vivo*, *in vitro* 시험결과를 비교, 검증하기 위해선 약물의 분포와, 대사과정에 참여하는 효소에 대한 속도론적인 이해가 필요하다. 이런 시각에서, 일례로 capsaicin의 NADH-quinone oxidoreductase 저해작용은,²¹⁾ 본 연구와 Kawada 등의^{9,22)} capsaicin 대사실험 결과를 볼 때, 독물학적 차원에선 그 독성을 인정하기 어렵다. Capsaicin의 강한 자극성은 지용성 추출 말단에 위치한 vanillyl (4-hydroxy-3-methoxybenzyl) group의 존재에 주로 기인하는데²³⁾ vanillyl group은 생체내 catecholamine의 정상적인 대사산물로서도 나타나고 있다. Vanillin은 식품 첨가제(취에서 경구 최소 치사량이 3.0 g/kg²⁴⁾)로서도 사용되고 있는바 그 자체는 물론이고 대사물인 vanillic acid, vanillyl alcohol도 독성 물질이라고 보기는 어렵다. 하지만 capsaicin 대사과정의 첫번째 과정인 가수분해에 의해 생성된 vanillylamine과 8-methyl-6-transnonenoic acid이 capsaicin에 비해 더 독성이 강하지 혹은 특별한 생리작용을 가지는 지에 대해선 알려진 바가 없다. 그럼에도 불구하고 이 가수분해반응이 capsaicin의 대사에서 가장 중요한 과정이란 점은 명백하다.

Lee 등은 phenobarbital로 유도되어진 환취의 microsome에서 NADPH regenerating system이 존재할 때, capsaicin은 ω (omega)-hydroxylation⁷⁾ 또는 ring hydroxylation에 의해 4,5-dihydroxy체가 생성되는⁶⁾ 대사경로를 거침을 밝혔다. Miller등은²⁵⁾ 이 4,5-dihydroxy체가 생성되기 위해서 capsaicin의 vanillyl ring이 epoxide 구조를 거칠 것이라 예측하고 이 epoxide가 마이크로솜내의 약물대사효소계와 공유결합을 형성함을 *in vivo*, *in vitro* 실험 결과와 함께 보고하였다. 그런데 NADPH 생성 system을 가지지 않은 본 실험에서 그리고 Kawada의^{8,9)} *in vivo*, *in vitro* capsaicin 대사실험에서는 이 4,5-dihydroxy체가 검출되지는 않았다. 이를 보면 capsaicin의 대사경로중 한가지로 ring hydroxylation을 생각할 수 있으나 이는 NADPH의 공급 등과 관련된 mixed function oxidase의 활성화에 따라 가변적이고 capsaicin의 대사란

관점에서만 볼 때에는 그 기여가 미미할 것으로 생각된다. 하지만 소량일지라도 ring hydroxylation이 일어나면서 Miller가 보고한 바대로 epoxide체가 대사효소와 공유결합을 형성한다면 metabolic activation란 새로운 관점으로 capsaicin의 작용기전을 바라보아야 한다. 가수분해를 통한 capsaicin의 주된 대사과정을 전혀 고려하지 않고 얻은 Miller의 결과는 특히 Kawada의²²⁾ 약물속도론 실험 결과와 비교해 볼 때 문제가 있는 것으로 생각된다. 본 실험에서도 capsaicin이 조직의 지질부위에 비특이적으로 강력하게 결합함을²⁶⁾ 알 수 있었는데, 이를 capsaicin의 active metabolite가 단백질과 공유결합을 형성했다고 보았던 것으로 판단된다. 요컨대, capsaicin의 *in vivo* 대사에서 mixed function oxidase를 거친 대사경로 혹은 metabolic activation을 완전히 무시할 수는 없지만, 지금까지의 연구결과만 가지고는 capsaicin은 거의 대부분 가수분해를 통한 Fig. 1의 대사과정을 거쳐 대사물 자체로 또는 glucuronide 포함체로서 노로 배설된다고 볼 수 있다.

본 연구에선 capsaicin 가수분해효소 활성측정의 방법으로 처음엔 TLC 발색 반응이나 vanillylamine의 ninhydrin 반응물의 UV/visible 흡광도 스펙트럼(data not shown)을 이용했다. 그런데 이 효소의 소재를 밝히는데 문제가 되는 것이 이 효소의 활성이 리소솜 분획, 세포질 분획에서도 나타난다고 하는 사실인데, 각 분획에 대한 표지효소활성을 측정할 결과 리소솜 분획, 세포질 분획에서도 소포체의 표지효소인 NCCR (NADPH cytochrome c reductase)과 NDPase(nucleoside diphosphatase)의 활성이 나타났다. 이는 분획 원심분리법에 의한 분획화 과정으로는 각 분획에 특정 세포내소기관이 상대적으로 다량 분포하게되나 다른 소기관의 혼입을 완전히 배제시킬 수는 없기 때문이다. 예를 들어 마이크로솜 분획의 경우 70% 정도가 소포체이고 리소솜, 미토콘드리아, 핵 등의 파편도 상당량 섞여 있다고 알려져 있는데 이 비율은 homogenization의 세기와 시간에 따라 달라질 수 있다. 또한 TLC 발색 반응이나 vanillylamine의 ninhydrin 반응물의 UV/visible 흡광도 스펙트럼을 이용한 방법으로는 vanillylamine의 정량이 힘들고, Fig. 1에서 본 바와 같이 vanillylamine은 계속되는 대사과정을 거치면서 깨어져 나가므로 측정법 자체의 신뢰도에

문제가 있을 수 있다. 하지만 capsaicin을 과량 반응시켰으므로 각 분획에서 효소활성의 세기를 상대적으로 평가하는 데는 무리가 없었다. 정량적인 data를 얻기 위해서 HPLC를 사용했는데, 반응 후 남은 capsaicin의 양을 측정했으므로 이후의 반응 진행 여부에 무관하게 capsaicin 가수분해효소의 활성을 측정할 수 있었다. 이 결과는 TLC 발색 반응이나 UV/visible 흡광도 스펙트럼을 이용한 실험 결과와도 부합되었다. 이 결과와 각 분획에서 표지효소의 분포 패턴을 비교해서 소포체의 표지효소인 NCCR(NADPH-cytochrome c reductase), NDPase(nucleoside diphosphatase)의 각 분획에서의 분포 패턴과 가수분해효소 활성이 일치함을 보고 이 효소가 소포체에 존재함을 증명하였다. 이는 이 효소의 최대활성 pH가, 세포내 소화를 담당해 많은 종류의 가수분해효소를 함유한 리소좀의 적절 pH인 4.8과는 큰 차이가 난다는 사실에 의해서도 더욱 뒷받침이 된다. Oi의¹⁰⁾ 실험에 의해서도 trypsin, protease(bacterial & fungal protease), peptidase, aminoacylase 등 다양한 산아미드결합에 대한 가수분해력을 지닌 효소들에 의해서 capsaicin의 산아미드결합이 깨어지지 않음이 밝혀졌는데 이를 보면 capsaicin 가수분해효소는, 주로 위장관에 분비되거나 리소좀에 존재하는 거대 단백질분자의 펩티드결합을 깨는 효소들과는 그 종류가 다름을 알 수 있다.

근년에 capsaicin의 유사체를 합성해 새로운 기전의 비마약성 소염진통제를 개발하려는 노력이 진행되고 있는데, 경구용 약제개발 등¹²⁾ 투여경로의 개선, 약리 작용해명, 활성이 증가된 새로운 약제개발에도 약물의 대사과정 검토가 중요하게 되었다. Capsaicin 가수분해효소의 세포내 소재가 밝혀졌으므로, 이를 바탕으로 이 효소의 소포체내 위치 규명, 분리, 정제, 諸 특성 규명이 필요하다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 서울대학교 약학교육 연구재단의 지원에 의해 이루어짐.

문헌

1) Jancso, N.: in *Third Hungarian Conference on The-*

rapy and Pharmacological research, Publishing House of Hungarian Academy of Sciences, Budapest, **23**(1964).

- 2) Suzuki, T. and Iwai, K.: Constituents of red pepper species; Chemistry, biochemistry, pharmacology and food science of the pungent principle of capicum species, *The Alkaloids* **23**, 227(1984).
- 3) Donnerer, J. and Lembeck, F.: Analysis of the effect of intravenously injected capsaicin in the rat, *Nunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **320**, 54(1982).
- 4) Szolcsany, J.: Capsaicin type pungent agents producing pyrexia, in *Handbook of Experimental Pharmacology* **60**; Pyretics and Antipyretics, Springer-Verlag, Berlin, 437(1980).
- 5) Buck, S. H. and Burks, T. F.: The neuropharmacology of capsaicin; Review of some recent observations, *Pharmacological reviews* **38**, 179(1986).
- 6) Lee, S. S. and Kumar, S.: *Microsomes, Drug oxidations and Chemical Carcinogenesis*. Vol 2., ed. by J. Coon et al., Academic Press . New York, 1009 (1980).
- 7) Lee, S. S. and Surh, Y. J.: ω (omega)-Hydroxycapsaicin, a new biotransformation products of capsaicin by rat liver enzyme systems, *J. Prot. Chem.* **5**, 292(1986).
- 8) Kawada, T., Suzuki, T., Takahashi, M. and Iwai, K.: Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats, *Toxicology and Applied Pharmacology* **72**, 449(1984).
- 9) Kawada, T. and Iwai, K.: *In vivo* and *in vitro* metabolism of dihydrocapsaicin, a pungent principle of hot pepper, in rats, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 441 (1985).
- 10) Oi, Y., Kawada, T., Watanabe, T. and Iwai, K.: Induction of capsaicin hydrolyzing enzyme activity in rat liver by continuous oral administration of capsaicin, *J. Agric. Food. Chem.* **40**, 467(1992).
- 11) Nopanitaya, W.: Effects of capsaicin in combination with diets of varying protein content on the duodenal absorptive cells of the rat, *Dig. Dis. Sci.* **19**, 439(1974).
- 12) Brand, L., Berman, E., Schwen, R., Loomans, M., Janusz, J., Bohne, R., Maddin, C., Gardner, J., La-

- hann, T., Farmer, R., Jones, L., Chiabrando, C. and Fanelli, R.: NE-19550. A novel, orally active anti-inflammatory analgesic, *Drugs Exptl. Clin. Res.* **8**(5), 259(1987).
- 13) Spector, T.: Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation, *Anal. Biochem.* **86**, 142 (1978).
- 14) Lambert, N. and Freedman, R. B.: The latency of liver microsomal protein disulfide-isomerase, *Biochem. J.* **228**, 635(1985).
- 15) Murray P. Deutscher: *Methods in Enzymology* 182; Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., San Diego, California 92101, 215(1990).
- 16) Rickwood, D.: *Centrifugation, a practical approach* (2nd edition), IRL Press, Oxford. Washington D. C., 307(1984).
- 17) Snell, K. and Mullock, B.: *Biochemical toxicology, a practical approach*, IRL Press, Oxford. Washington D. C., 200(1987).
- 18) Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J.: Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods, *J. Cell Biol.* **61**, 188(1974).
- 19) Baginski, E. S., Foa, P. P. and Zak, B.: in *Methods of Enzymatic Analysis* 2, Verlag Chemie/Academic Press, New York, 876(1974).
- 20) La Du, B. N., Mandel, H. G. and Way, E. L.: *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, (1971).
- 21) Yagi, T.: Inhibition by capsaicin of NADH-quinone oxidoreductases is correlated with the presence of energy-coupling site 1 in various organisms, *Arch. Biochem. Biophys.* **281**, 305(1990).
- 22) Kawada, K., Watanabe, T., Katsura, K., Takami, H. and Iwai, K.: Formation and metabolism of pungent principle of Capsicum fruits; Microdetermination of capsaicin by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatography*, **329**, 99(1985).
- 23) Szolcsanyi, J. and Jancso-Gabor, A.: Sensory effects of capsaicin congeners. Part II. Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds, *Arzneim-Forsch*, **26**, 33(1976).
- 24) Windholz, M., Budavari, S., Stroumtsos, L. Y. and Ferting, M. N.: *The Merck Index*. ninth edition, Merck & Co., Inc., New jersey, 9566(1979).
- 25) Miller, S. M., Brendel K., Burks, T. F. and Sipes, G.: Interaction of capsaicinoids with drug-metabolizing systems, *Biochem. Pharmacology* **31**(3), 547 (1983).
- 26) Boersh, A., Callingham, B. A., Lembeck, F. and Sharman, D. F.: Enzymic oxidation of capsaicin, *Biochem. Pharmacology* **41**(12), 1863(1991).