

## 천연 페놀성 화합물들의 방향족 아미노산 탈탄산효소 저해작용

유시용\* · 한용남\* · 한병훈  
서울대학교 천연물과학연구소, \*한국화학연구소  
(Received July 26, 1994)

### Inhibition of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (AADC) by Some Phenolic Compounds from Medicinal Plants

Shi Yong Ryu\*, Yong Nam Han and Byung Hoon Han  
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460  
\*Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

**Abstract**—Sixteen kinds of naturally occurring phenolic compounds including 5 stilbenes, 7 flavonoids and 4 anthraquinones were examined in the inhibitory activity against rat liver AADC (aromatic L-amino acid decarboxylase) *in vitro*, using 5-hydroxytryptophan as a substrate. Three hydroxystilbenes, resveratrol **1**, rhapontigenin **3** and piceatanol **5**, which were known to be monoamine oxidase A inhibitors, exhibited a significant inhibition against AADC ( $IC_{50}$  = 20, 8 and 5  $\mu$ M, respectively). By the comparison of the activity of each phenolic compound, it was suggested that the 3',4'-dihydroxyphenyl group of stilbenes or flavones was the best pharmacophore for the AADC inhibitory activity.

**Keywords** □ AADC, Aromatic amino acid decarboxylase, AADC inhibitor, Rapontigenin, Resveratrol, Piceatanol, Stilbene, Flavone, MAO, Monoamine oxidase.

방향족아미노산탈탄산효소(AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase, EC 4.1.1.28.)는 일명 DOPA 탈탄산효소(DDC:DOPA decarboxylase)라고도 불리우며 tyrosine, DOPA (dihydroxyphenylalanine) 및 5-hydroxytryptophan 등 모든 aromatic L-amino acid들을 탈탄산하여 tyramine, dopamine 및 serotonin (5-hydroxytryptamine) 등을 생성하는 효소로서 동물체내에서 epinephrine, norepinephrine, dopamine 등 각종 catecholamine 및 serotonin과 같은 신경전달물질들의 생합성에 있어 필수적인 역할을 담당하고 있다.

저자 등은 이 효소반응을 특이하게 저해하는 enzyme inhibitor들을 천연으로부터 찾아보고자 하는 취지 하에 일차적으로 30여종의 식물을 대상으로 이들의 MeOH추출물을 시료로 하여 시험관내 효소저해활성을 검색하여 본 결과 종대황(*Rheum undula-*

*tum*, Polygonaceae), 소엽(*Perilla frutescens*, Labiatae), 인진호(*Artemisia capillaris*, Compositae), 감국(*Chrysanthemum indicum*, Compositae), 호장근(*Polygonum cuspidatum*, Polygonaceae) 등이 강력하게 효소반응을 저해하고 있음을 알 수 있었다.<sup>1)</sup> 또 저자들은 이들 식물로부터 효소저해물질을 분리하고자 효소저해작용을 지표로 하여 activity-guided isolation방법에 따라 효소저해활성을 나타내는 활성물질을 추적한 결과 종대황 및 호장근으로부터 resveratrol **1**, rhapontigenin **3** 등 hydroxystilbene계 화합물을 활성성분으로 최종 단리한 바 있다.<sup>1)</sup> 본보에서는 이들 hydroxystilbene계 화합물들을 포함하여 flavonoid 및 anthraquinone류 등 각종 phenolic compound들의 시험관내 AADC저해효과에 대하여 보고하고자 한다. 아울러 이들 화합물들은 이미 전보<sup>2)</sup>에 보고한 바대로 흰취의 monoamine oxidase-A(MAO-A)에 대하여도 강력한 저해활성을 나타내고 있는 바

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

각 화합물들의 AADC저해효과와 MAO-A저해효과를 상호 비교검토 하였다.

### 실험방법

**AADC(Aromatic L-amino acid decarboxylase)활성 및 저해작용의 측정<sup>3,4)</sup>**—Umezawa 등의 방법에 따라 흰쥐의 liver homogenate를 처리하여 효소원으로 사용하였다. 즉 체중 150~250 g의 S.D.계 웅성 흰쥐를 경동맥을 잘라 실험시키고 즉시 간을 적출하여 0.01M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.0)으로 세척한 후 습중량 1 g당 0.003M mercaptoethanol 2 ml를 가하여 2분간 waring blender(Omni mixer 17105, Dupont instrument)로 마쇄하였다. 이를 즉시 4°C에서 700 g로 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 18,000 g로 재차 20분간 원심분리하였다. 상등액은 버리고 pellet를 PBS 5 ml에 현탁시켜 -15°C freezer에 동결보관하고 용시 실온에서 defrost하여 효소원으로 사용하였다.

효소원 0.5 ml, 검액 1.0 ml 및 보조액 0.5 ml를 시험관에 넣고 37.5°C 항온조에서 15분간 incubation하고 난 후 4 mM 5-hydroxytryptophan 0.5 ml를 가하고 계속하여 90분간 incubation시켰다. 보조액은 pyridoxal phosphate(cofactor, Sigma Co.)와 iproniazid phosphate(MAO inhibitor, Sigma.Co.)를 각각 반응액 중에서의 농도가 0.1 mM, 1.0 mM이 될수 있도록 미리 0.1M tris-HCl buffer(pH 8.5)에 녹여 조제한 용액이다. 반응액을 95°C 수욕상에서 3분간 끓여 반응을 중단시키고 충분히 식힌후 700 g로 5분간 원심분리하고 상등액 2.0 ml를 취하여 미리 준비한 Amberite CG-50(H type) column(0.6×4.0 cm)에 부어넣었다. 40 ml 이상의 증류수로 Amberite resin을 충분히 세척한 후 4N acetic acid 3 ml를 가하여 용출액을 따로 취하여 277 nm에서 흡광도(A; absorbance)를 측정하였다. 검액군(sample) 이외에 별도로 검액대신 동량의 증류수를 가한 대조군(control), 반응개시점 대신 반응종말점에서 기질용액(5-hydroxytryptophan)을 넣은 공시험군(blank, zero time) 및 기질용액 대신 동량의 buffer solution을 넣어준 검액보정군(sample control)을 함께 실행하였으며 각군은 모두 duplicate로 실행하여 평균치를 환산하였으며 효소저해율(% Inhibition)은 다음 수식에 따라 산출하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample control}})}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

검액용액은 검체화합물을 소량의 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인후 증류수로 희석하였으며, 반응액 중에서의 DMSO농도가 0.5% 이상을 초과하지 않도록 하였다. 단계적으로 희석한 검액들의 효소저해율을 토대로 하여 검체화합물의 50% 효소저해농도(IC<sub>50</sub>)를 산출하였다.

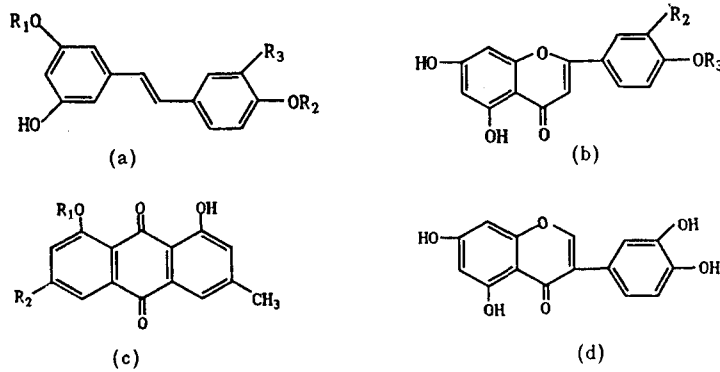
**페놀성 화합물의 분리**—실험에 사용된 각종 시료 화합물들은 각각 호장근(resveratrol 1 and piceid 2), 종대황(rhapontigenin 3, rhaponticin 4, chrysophanol 13, physcion 14, emodin 15 and emodin-glucoside 16), 감국(luteolin 8, apigenin 9, acacetin 11 and diosmetin 12) 및 괴화(querctetin 6, rutin 7 and kaempferol 10) 등으로부터 분리<sup>2,5)</sup> 혹은 분리된 화합물(3)을 이용하여 합성(piceatanol 5)<sup>한<sup>6,7)</sup></sup> 표품들을 사용하였다.

### 실험결과 및 고찰

방향족 아미노산 탈탄산효소(AADC)에 대한 시험관내 효소활성저해작용을 지표로 하여 activity-guided isolation 방법에 따라 대황 및 호장근으로부터 단리한 2종의 활성성분(1 and 3)을 포함한 5종의 stilbene계 화합물을 비롯하여 이들 화합물들과 유사한 부분구조를 가지고 있는 7종의 flavonoid 및 4종의 anthraquinone계 화합물들에 대하여 각각 시험관내 AADC저해활성을 조사하여 보았다(Table I).

이 중 stilbene계 화합물들이 상대적으로 우수한 효소저해활성을 나타내었으며 치환기의 종류 및 결합위치에 따라 활성도의 차이를 보여주었다. 즉 stilbene골격의 3-hydroxyl기(-R<sub>1</sub>)에 glucose가 결합된 piceid 2 또는 rhaponticin 4의 경우에는 활성이 거의 소실되었으며, hydroxyl기가 4개 치환된 piceatanol 5 및 3개의 hydroxyl기와 1개의 methoxy치환기를 가진 rhapontigenin 3은 각각 hydroxyl기만 3개 치환된 resveratrol 1에 비하여 강한 활성이 관찰되었다. 특히 A환의 3,5번 위치, B환의 3',4'번 위치에 각각 hydroxyl기가 결합된 piceatanol 5은 가장 우수한 활성을 보여주었다. Flavonoid계 화합물들은 stilbene계 화합물들에 비하여 상대적으로 약한 활성을 나타내었으며 특히 이 중 A환의 5,7번과 B환의 3',4'번 위치에

**Table I**—Enzyme inhibitory activity of some naturally occurring phenolic compounds against AADC(aromatic L-amino acid decarboxylase) and MAO-A(monoamine oxidase-A) *in vitro*



Compound	R1	R2	R3	IC <sub>50</sub> (μM)*		
				AADC	MAO-A	
stilbene (a)	1	-H	-H	-H	20	2
	2	-Glu	-H	-H	>1000	35
	3	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	8	24
	4	-Glu	-CH <sub>3</sub>	-OH	>1000	>1000
	5	-H	-H	-OH	5	15
flavonoid (b)	6	-H	-OH	-OH	80	100
	7	-H	-OH	-O-Rut.	800	>1000
	8	-H	-OH	-H	80	100
	9	-H	-H	-H	>1000	10
	10	-H	-H	-OH	NT	10
	11	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	>1000	>1000
	12	-CH <sub>3</sub>	-OH	-H	>1000	>1000
anthraquinone (c)	13	-H	-H		>1000	>1000
	14	-H	-OCH <sub>3</sub>		>1000	>1000
	15	-H	-OH		200	50
	16	-Glu	-OH		400	>1000
isoflavonoid (d)**	17				0.03	

\*IC<sub>50</sub> value of each compound was determined as a concentration(μM) that caused 50% inhibition of the corresponding enzyme activity *in vitro*.

\*\* The IC<sub>50</sub> value of orobol against AADC was measured by Umezawa *et al.*<sup>4)</sup>

각각 hydroxyl기가 치환된 quercetin 6과 luteolin 8이 비교적 양호한 활성을 보여주었다. 또 anthraquinone계 화합물들은 A환의 6(-R<sub>2</sub>),8(-R<sub>1</sub>)번 위치에 hydroxyl기가 1,3-diol type으로 치환된 emodin 15 및 그 배당체 16만이 약한 활성을 나타내고 있을 뿐 기타 화합물들은 거의 활성을 나타내지 못하였다.

특히 활성을 나타내는 화합물들(1, 3, 5, 6, 8, 15 and 16)은 각각 그 기본골격(a,b,c)의 형태에 따라 활성도의 차이를 보여주고 있기는 하지만 A환에 2개의

hydroxyl기가 1,3-diol 결합양식에 따라 치환되어 있고 B환에 2개의 hydroxyl기가 각각 3',4'번 위치에 1, 2-diol형태로 결합하고 있을때(5, 6 and 8) 가장 우수한 활성을 나타내었다. 일찌기 Umezawa 등은 수종의 미생물 배양액으로부터 AADC저해작용을 나타내는 활성성분들을 단리하여 보고<sup>4,8,9)</sup> 하였는데 이들이 분리한 활성성분들을 모두 isoflavonoid계 화합물이었으며 그 중 가장 강력한 활성을 보여준 화합물은 A환의 5,7번 위치에 각각 hydroxyl기가 1,3-diol형태

로 결합되어 있고 B환의 3',4'번 위치에 hydroxyl기가 1,2-diol 형태로 결합하고 있는 orobol 17이었으며, orobol 17의 B환의 3'번에 치환된 hydroxyl기가 이탈된 genistein (5,7,4,-trihydroxyisoflavone)의 경우 활성이 현저하게 감소(IC<sub>50</sub>=200 μM)되는 경향을 나타내었다. 이와 같은 양상의 구조활성 상관관계는 이미 Umezawa 등이 보고한 바대로 isoflavonoid계 화합물들에 있어서 뿐만 아니라 본 연구를 통하여 밝혀진 바와 같이 flavonoid 및 stilbene계 화합물들이 AADC저해활성을 나타내는데 있어서도 같은 양상을 띄고 있음을 알 수 있다.

한편 전보<sup>2)</sup>에 보고한 바대로 이들 stilbene계 및 flavonoid계 화합물들은 쥐의 뇌에 존재하는 MAO-A(monoamine oxidase-A)에 대하여도 저해효과를 나타내고 있으며 각 화합물들의 MAO-A저해활성은 Table I에 표시된 바와 같다. 흥미롭게도 이 경우에 있어서는 AADC저해활성의 경우에 보여 주었던 바와는 상반된 양상의 구조활성 상관관계가 관찰되었다. 즉, stilbene계 화합물의 경우 B환의 4'번 위치에 한 개의 hydroxyl기만 치환된 resveratrol 1이 2개의 hydroxyl기가 각각 3',4'번 위치에 1,2-diol 형태로 치환된 rhapontigenin 3 및 piceatanol 5보다 강한 활성을 나타내고 있다. 또 flavonoid계 화합물들의 경우에도 apigenin 9 및 kaempferol 10이 quercetin 6 및 luteolin 8보다 강한 활성을 보여주고 있어 stilbene계 화합물들의 경우와 마찬가지로의 구조활성 상관관계가 적용되고 있음을 알 수 있다. 본 연구에서 시료화합물로 사용한 각종 phenolic compound들이 이와 같이 그 기능측면에서 볼 때 서로 무관한 두가지의 효소에 대하여 서로 다른 구조활성 상관관계에 따라 저해작용을 나타내고 있음은 무척 흥미로운 사실이며 이와 같은 연구결과는 차후 이들 AADC 및 MAO-A효소의 반응기전 등의 연구에 있어서도 큰 보탬을 줄 수 있으리라 사료된다.

### 감사의 말씀

이 연구는 한국과학재단의 연구비지원에 의한 결

과이며 이에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Han, Y. N., Cheong, M. S., Ryu, S. Y., Kim, T. H. and Han, B. H.: Studies on the inhibitory components against aromatic L-amino acid decarboxylase. *Abstracts of the 17th annual convention of Korean Society of Pharmacognosy.* p.56. (1986).
- 2) Ryu, S. Y., Han, Y. N. and Han, B. H.: Monoamine Oxidase-A inhibitors from medicinal plants. *Arch. Pharm. Res.*, **11**, 230 (1988).
- 3) Lovenberg, W., Weissbach, H. and Udenfriend, S.: Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, **237**, 89 (1962).
- 4) Umezawa, H., Tobe, H., Shibamoto, N., Nakamura, F., Nakamura, K., Matsuzaki, M. and Takeuchi, T.: Isolation of isoflavones inhibiting DOPA decarboxylase from Fungi and Streptomyces. *J. Antibiotics*, **18**, 947 (1975).
- 5) Han, Y. N., Noh, D. B. and Han, D. S.: Studies on the Monoamine oxidase inhibitors from medicinal plants I. Isolation of MAO-B inhibitors from *Chrysanthemum indicum*. *Arch. Pharm. Res.*, **10**, 132 (1987).
- 6) Bachelor, F. W., Loman, A. A. and Snowdon, L. R.: Synthesis of pinosylvin and related heartwood stilbenes. *Canadian J. Chem.*, **48**, 554 (1970).
- 7) Drewes, S. E. and Fletcher, I. P.: Polyhydroxystilbenes from heartwood of *Schotia brachypetala*. *J. Chem. Soc. Perkin* **1**, 961 (1974).
- 8) Baker, D., Downing, D. F., Floyd, A. J., Gilbert, B., Ollis, W. D. and Russel, R. C.: Synthesis of isoflavones. V. Irogenin and tectorigenin. *J. Chem. Soc. C. Organic Chemistry*, 1219 (1970).
- 9) Tobe, H., Naganawa, H., Takita, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Structure of a new isoflavone from fungi and streptomyces inhibiting DOPA decarboxylase. *J. Antibiotics*, **29**, 623 (1976).