

잠뇨로부터 질소함유 당물질 분리 및 glycosidase에 대한 저해활성

송주경 · 정성현*
경희대학교 약학대학

Isolation of N-Containing Sugars from Silkworm Urine and Their Glycosidase Inhibitory Activities

Ju Kyung SONG and Sung Hyun CHUNG*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

(Received August 2, 1998; accepted September 3, 1998)

Abstract - Glycosidase inhibitors from urine of *Bombyx mori* were isolated and their inhibitory activities on glycosidases were evaluated. Six compounds were isolated by using several ion exchange columns, and their chemical structures were identified by the physicochemical and spectral data. Compound IV, V and VI were identified as 1-deoxynojirimycin, fagomine and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, respectively. Among six compounds isolated, 1-deoxynojirimycin(IV) was the most potent inhibitor on α -glucosidase and β -galactosidase of rat intestine, and its inhibitory activities for trehalase and almond β -glucosidase were relatively weak. Compound V and VI retained a little inhibitory potency toward α -glucosidase and β -galactosidase. Compound II and III, however, have been found to have no effect on all glycosidases tested in this study.

Keywords □ silkworm urine, glycosidase, ion exchange column, 1-deoxynojirimycin, fagomine, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol

Glycosidase 효소는 소장과 간 조직내에서 다당류내의 당과 당, 당과 지질 또는 당과 단백질간의 glycoside 결합을 끊어주는 효소이다. Glycosidase 효소반응을 억제할 경우 소장에서는 당의 흡수가 지연됨으로 당뇨와 비만증 치료에 효과적인 약효를 나타냄이 이미 알려져 있고 또한 당단백질 성숙과정에 관여하는 여러 glycosidase 반응이 차단될 경우에는 항바이러스(Gruters 등, 1987) 또는 암전이에방 등의 약효도 나타낼 수 있음이 보고되고 있다.

이제까지 문헌상에 보고된 glycosidase 저해제들은 분자내에 수산기를 많이 함유하고 환구조안에 질소를 가지고 있는 polyhydroxylated alkaloid가 주종을 이루고 있다. 이들은 구조적으로 여섯가지 형태로 나눌 수 있다.

첫째, acarbose는 Actinoplanes 균에서 분리된 물질로 acarviosine 구조에 maltose 한 분자가 결합된 형태이다. 현재 임상에서 제2형 당뇨에 널리 사용되는 약제이다.

둘째, monocyclic piperidine 계열로 deoxynojirimycin이 대표적인 물질이다. 이 물질은 거의 모든 종류의 glyco-

sidase에 대해서 강력한 억제활성을 나타내며(Elbein, 1991) 1976년 Yagi 등에 의해 처음으로 뽕나무속 식물에서 발견된 이래(Yagi 등, 1976) 최근에는 *Morus bombycis* 잎과 *Morus alba* 뿌리에서 각각 발견되었다(Asano 등, 1994).

셋째, bicyclic indolizidine 계열로 castanospermine과 swainsonine이 있다. Castanospermine은 호주산 밤나무(*Castanospermum australe*)의 종자로부터 얻은 물질이고 swainsonine의 경우는 자운영속 식물인 로코풀(*Swainsona canescence*)에서 얻은 물질이다. Castanospermine은 당단백질의 당분해에 관여하는 효소인 glycosidase I과 II에 억제 활성뿐만 아니라 소장내 α -glycosidase, β -glycosidase에도 강력한 경쟁적 저해활성을 나타낸다(Pan 등, 1983). Swainsonine은 간 라이조솜내의 α -mannosidase와 골기체내의 mannosidase II에 강력한 억제제로서 비장세포의 증식을 촉진시켜 그 결과 natural killer cell의 활성을 증강시킴으로 암의 전이를 차단하는 면역조절제 역할에 대한 연구결과가 보고된 바 있다(Tulsiani 등, 1985).

넷째, bicyclic pyrrolizidine 계열로 australine이 있다. Australine 역시 호주산 밤나무의 종자로부터 분리된 알칼로이

* To whom correspondence should be addressed.

드로 α -glucosidase에 대해서는 강력한 억제활성이 있는 반면 β -glucosidase, α -mannosidase에 대해서는 억제활성이 없다. Australine은 소포체내의 당단백질분해 효소중의 하나인 glycosidase I에 대해서도 억제효과를 나타낸다(Tropea 등, 1989).

다섯째, polyhydroxy-nortropane 계열로 calystepin A, B, C가 있다. 이들은 메꽃속 식물(*Calystegia sepium*)의 뿌리로부터 처음으로 분리되어 보고된 물질들로 1994년 Asano 그룹은 뽕나무(*Morus alba*)뿌리에서 calystepin B₂, calystepin C₁ 등을 분리하여 구조를 밝힌바 있다.

여섯째, monocyclic pyrrolidine 계열로 2,5-dihydroxymethyl-3,4-dihydroxy-pyrrolidine(DMDP)가 있다. DMDP는 5원환의 β -D-fructofuranose 유도체로 *Derris elliptica*의 잎, *Lonchocarpus sericeus* 종자에서 분리된 물질이다. DMDP는 α 및 β -glucosidase에 대해 deoxynojimycin 보다 10~60배 큰 억제활성을 나타내며 그 억제양상은 경쟁적저해인 것으로 알려지고 있다(Card와 Hitz, 1985).

누에는 애벌레동안 별도의 오줌을 배설하지 않고 단지 똥으로 다소의 수분을 방출한다. 이렇게 애벌레 기간을 지나게 되면 고치를 짓게 되는데 이 때 일생에 단 한번의 오줌을 배설하게 된다(류와 정, 1998). 이렇듯 오줌 혹은 분으로 뽕잎의 성분들이 배설된다는 사실과 과거 민간에서 누에오줌(蠶尿)을 받은 종이를 태워 잿가루로 만들고 꿀로 개어서 만든 환을 입이 마르고 갈증이 나는 消渴症(지금의 당뇨) 치료에 사용하여 왔다는 사실에 근거하여, 본 연구실에서는 잠노의 소장내 α -glycosidase 효소반응에 대한 저해유무를 시험관내와 생체내에서 기존의 glycosidase 저해제인 acarbose와 비교해 본 결과 소장내 α -glycosidase를 강력하게 저해한다는 사실을 알게되었다.

누에오줌과 상엽의 물가용 분획이 흰쥐 소장내 α -glycosidase 저해활성이 있음을 시험관내 및 생체내 실험을 통하여 밝힌바(Song과 Chung, 1998; Lee 등, 1995) 있는 본 연구실의 연구결과를 바탕으로, 본 연구에서는 누에오줌내 glycosidase 저해작용을 나타내는 활성물질을 분리하고 이들의 여러 glycosidase에 대한 저해활성을 살펴보았다.

실험재료 및 방법

실험재료 및 동물

본 실험에 사용한 누에오줌은 잠사곤충연구소로부터 공급받아 이를 여과하여 동결건조한 후 성분분리에 사용하였다. SD계 흰쥐(150~200 g) 및 고품사료는 (주)대한실험동물센터(충북 음성)에서 구입하여 항온항습실(온도 25°C, 습도 50%)에서 자유로이 사료와 물을 공급하였고 본 실험실 환경에 1주일간 적응시킨후 건강상태가 양호한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

Maltose, sucrose, lactose, isomaltose, glucose, trehalose, p -nitrophenyl α -D-glucopyranoside, p -nitrophenyl β -D-glucopyranoside, p -nitrophenyl α -D-mannopyranoside, p -nitrophenyl β -D-galactopyranoside, PIPES buffer, Tris-HCl, 2-mercaptoethanol, almond β -glucosidase, jack bean α -mannosidase, bovine liver β -galactosidase, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, Trinder 등은 Sigma사로부터 구입하였다. Column chromatography material로 Dowex 1-X2-400(Cl⁻ form), Amberlite IRC-50(H⁺ form), Amberlite MB-1(H⁺/OH⁻ form) 등은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며 TLC plate Keisegel 60F는 Merck사로부터 구입하였고, HPTLC plate는 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다. 기타 유기용매는 시판 특급 혹은 일급시약을 사용하였다.

기기는 magnetic stirrer(MT2, Amicon, U.S.A.), high speed centrifuge(Supra 21K, Hanil, Korea), ultracentrifuge(OTD 75B, Dupont, U.S.A.), pH meter(HI-8418, Hanna instrument, Italy), UV spectrophotometer(U-3210, Hitachi, Japan), vortex mixer(Maxi mixII, Termolyne, U.S.A.), Digi-Block (Laboratory Device, U.S.A.), fraction collector(KMC-2000, Vision, Korea), shaking water bath(Changshin Scientific, Korea), rotary evaporator(NE-1, EYELA, Japan), melting point apparatus(Mel-temp II, Lablatory Devices, U.S.A.), FABMS(VG Analytical, VG, 70-USEQ, U.S.A.), NMR (Bruker, AMX.500, Germany) 등을 사용하였다.

흰쥐 소장 glycosidase 효소액의 제조

SD계 흰쥐소장으로부터 glycosidase 효소의 분리하는 Rhinehart 등의 방법을 따랐다(Rhinehart 등, 1987). 웅성 흰쥐(150~200 g)를 하룻밤 절식시켜 사혈 치사시킨 후 소장 전체를 절취해 얼음 위에서 생리식염수로 장내용물을 세척하고 소장 안쪽의 점막층을 모아 0.5 M NaCl, 0.5 M KCl, 5 mM EDTA로 구성된 완충액(pH 7.0)을 가하여 현탁시킨 후 균질화하였다. 이를 20,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 얻어진 pellet에 다시 완충액을 가하고 같은 과정을 일회 반복하였다. 마지막으로 얻은 pellet에 5배의 생리식염수를 가하고 2,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 효소용액으로 사용하였다.

흰쥐 간 glycosidase 효소액의 제조

흰쥐 간의 소포체와 라이소좀내의 glycosidase의 분리하는 Opheim 등(1978)의 방법을 따랐다. 웅성 흰쥐(150~200 g)를 하룻밤 절식시켜 사혈 치사시킨 후 간을 절취해 생리식염수로 세척하였다. 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.25 M sucrose 용액중에서 간을 잘게 조각내어 세척한 뒤 4배의 sucrose 완충액으로 현탁시킨 후 균질화하여 1,500 g에서 10분 동안 원심분리하여 nuclear fraction(pellet)을 제거하고 다시 일회 반복하여 얻어진 pellet에

다시 완충액을 가하고 같은 과정을 일회 반복하여 상등액을 얻었다. 상등액을 8,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 상등액은 소포체내 glycosidase 효소액 제조에, pellet은 라이소솜내 glycosidase 효소액 제조에 사용하였다.

먼저 상등액을 sucrose 완충액으로 최종 농도가 20 ml/g liver가 되도록 희석시킨 후 마이크로솜을 침전시키기 위해 CaCl₂ 10 mM를 가하고 4°C에서 30분간 교반한 다음 12,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 마이크로솜 분획 (pellet)을 얻었다. 이것을 10 mM Tris-HCl(pH 7.2), 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.25 M sucrose 용액으로 재현탁시켜 소포체 glycosidase 효소액으로 하였다.

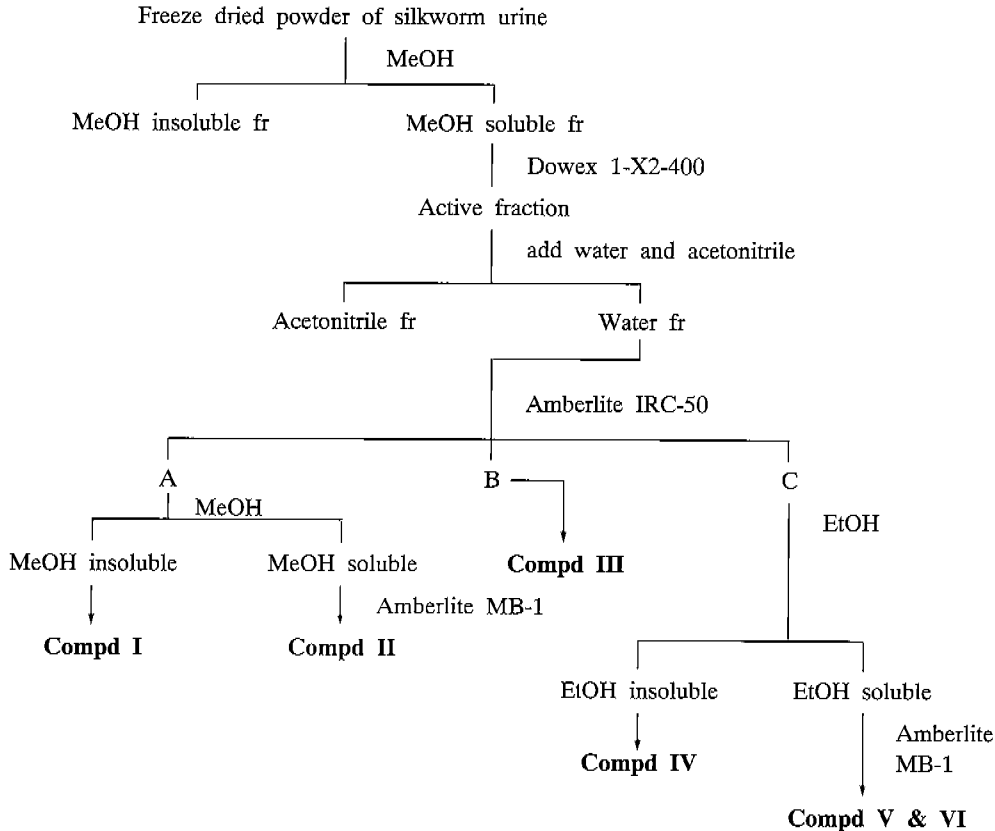
소포체내 glycosidase 효소액 제조에 사용한 상등액을 제외한 pellet은 다시 균질화, 원심분리시키고 상등액을 제거하여 얻은 라이소솜 분획을 10 mM sodium acetate(pH 6.0), 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM MgSO₄ 용액으로 균질화한 후 66,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 라이소솜 glycosidase 효소액으로 하였다.

누에오줌으로부터 glycosidase 저해제의 분리

누에오줌을 Whatman 여과지(No.1)로 여과하여 얻은 여액을 동결건조한 분말 400 g을 MeOH 20 liter에 넣고 하룻밤 동안 교반한 후 여과하여 메탄올가용부를 얻었다. 누에

오줌 메탄올가용부를 Dowex 1-X2-400 anion exchange column(3×45 cm, Cl⁻ form)에 loading한 후 50% 메탄올로 elution하여 얻은 분획을 농축한 후 다시 소량의 물과 acetonitrile을 가하여 acetonitrile 층과 물층으로 분획한 후 물층을 농축하여 Amberlite IRC-50 cation exchange column chromatography(3×45 cm, H⁺ form)를 실시하여 A,B,C subfraction을 얻었다. A subfraction을 감압농축한 후 메탄올을 가했을 때 백색 결정인 compound I을 얻었으며, 메탄올가용부는 다시 감압농축하여 Amberlite MB-1 cation/anion exchange column chromatography(1.5×30 cm H⁺/OH⁻ form)를 실시하여 0.1 M NH₄OH로 elution하여 얻은 eluate를 메탄올로 재결정하여 compound II를 얻었다. 한편 B subfraction은 에탄올로 세척하여 compound III를 얻었다. C subfraction에는 EtOH를 가하여 가용부와 비가용부로 나누는 후 비가용부는 메탄올로 재결정하여 compound IV를 얻었으며, 에탄올가용부는 Amberlite MB-1 column chromatography에 loading한 후 0.1 M NH₄OH로 elution하여 compound V와 compound VI를 얻었다.

Compound I-VI의 화학구조를 규명하기 위해 FABMS (H⁺), NMR(¹³C와 ¹H) spectroscopy를 실시하였고 또한 각 화합물에 대한 응점과 원소분석을 시행하였다. 누에오줌으



Scheme 1. Isolation of glycosidase inhibitors from silkworm urine.

로부터 glycosidase 저해제들의 분리과정을 도식하면 Scheme 1과 같다.

화합물 I-VI의 glycosidase 저해활성 검색

본 실험의 효소원으로는 시판 효소인 almond β -glycosidase, jack bean α -mannosidase, bovine liver의 β -galactosidase와 실험실에서 흰쥐 간과 소장점막으로부터 분리한 소포체내 α -glycosidase II, α -mannosidase 및 라이조좀 효소인 α -mannosidase, β -galactosidase 그리고 소장 점막으로부터 분리한 glycosidase(maltase-glucoamylase complex와 sucrase-isomaltase complex를 포함함)를 사용하였다.

효소반응의 기질로는 천연기질로 맥아당, 서당, 유당, trhalose 그리고 cellobiose를, 인공기질로 각 효소에 해당하는 p -nitrophenyl-glycoside를 사용하였다. 천연기질을 이용한 효소반응은 Trinder법에 따라 효소반응으로 인해 가수분해된 반응생성물의 양을 505 nm에서 흡광도를 측정하였고 인공기질의 경우는 반응결과 생성된 p -nitrophenol을 400 nm에서 흡광도를 측정하였다(Asano 등, 1994).

각 시료의 효소억제활성은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = (A-B)/A \times 100$$

A: Absorbance without test sample

B: Absorbance with test sample

결과 및 고찰

화합물 I-VI의 분리

누에오줌 메탄올가용부 250 g을 Dowex 1-X2-400 anion exchange column에 loading하여 glycosidase 저해활성이 높은 active fraction 8.3 g을 얻었다. Active fraction에 포함된 무기물을 제거하기 위해서 메탄올 가용부와 비가용부를 나누었다. 메탄올가용부에 다시 소량의 물과 acetonitrile을 가하여 acetonitrile(0.5 g)층과 물층(3.6 g)으로 분획한 후 물층을 농축하여 Amberlite IRC-50 cation exchange column chromatography를 실시하여 A,B,C의 세 subfraction을 얻었다. 곧 Amberlite IRC-50 column을 물로 elution시 fr 21~45(fraction size: 10 ml)에서 A subfraction 320 mg을 얻었고 fr 57~58에서는 B subfraction을 13 mg 얻었다. C subfraction은 0.5 M NH_4OH 로 elution하여 fr 98~120에서 900 mg을 얻었다.

A subfraction을 감압농축하여 메탄올을 가했을 때 백색 결정인 compound I(40 mg, 수득률: 0.01%)을 얻었다. 메탄올가용부는 다시 감압농축하여 Amberlite MB-1 cation/anion exchange column에 loading한 후 0.1 M NH_4OH 로 elution하였을때 fr 81~93(fraction size: 2.5 ml)에서 active fraction을 얻었고 이를 메탄올로 재결정하여 compound II (16 mg, 수득률 0.004%)를 얻었다.

B subfraction의 경우는 에탄올로 세척하여 compound III (13 mg, 수득률 0.0036%)를 얻었다.

C subfraction은 에탄올을 가하여 가용부와 비가용부로 나누었다. 비가용부를 메탄올로 재결정하여 compound IV (500 mg, 수득률 0.13%)를 얻었으며, 한편 에탄올가용부는 Amberlite MB-1 column에 loading 한후 0.1 M NH_4OH 로 elution하여 compound V(13 mg, 수득률 0.0035%)와 compound VI(11 mg, 수득률 0.002%)를 얻었다.

화합물 IV

백색의 침상결정으로 BuOH:EtOH:Water=2:10:3 조건에서 R_f 치가 0.42였고, m.p. 200°, 분자량 163이었다. NMR, FABMS 및 원소분석 결과는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 2.52(dd, 1H, $J_{1ax,1eq}=12.1$, $J_{1ax,2}=10.9$ Hz H_{1ax}), 2.61(ddd, 1H, $J_{1ax,1eq}=12.1$, $J_{1eq,2}=5.1$ Hz, H_{1eq}), 3.3(t, 1H, $J_{3,4}=J_{4,5}=9.1$ Hz, H_4), 3.38(t, 1H, $J_{2,3}=J_{3,4}=9.1$ Hz, H_3), 3.56(ddd, 1H, $J_{1ax,2}=10.9$, $J_{1eq,2}=5.1$, $J_{2,3}=9.1$ Hz, H_2), 3.7(dd, 1H, $J_{5,6ax}=6.2$, $J_{6ax,6eq}=11.3$ Hz, H_{6ax}), 3.84(dd, $J_{5,6eq}=2.9$, $J_{6ax,6eq}=11.3$ Hz, H_{6eq}); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 51.3 (C_1), 63.1(C_5), 64.7(C_6), 73.5(C_2), 74.1(C_4), 81.3(C_3); FABMS(NBA matrix) m/z 164(M+1); Anal ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4$) C,H,N

이상의 spectral data와 문헌에 기재된 1-deoxynojirimycin의 spectral data(Asano 등, 1995)가 일치하였으므로 compound IV를 1-deoxynojirimycin으로 동정하였다.

화합물 V

백색의 침상결정으로 BuOH:EtOH:Water=2:10:3 전개용매 조건에서 R_f 치가 0.28, m.p. 186°, 분자량 147이고 물에는 잘 녹으나 메탄올에는 녹지않았다. NMR, FABMS 및 원소분석 결과는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 1.51(ddt, 1H, $J_{1ax,2ax}=J_{2ax,2eq}=13.0$, $J_{1eq,2ax}=4.5$, $J_{2ax,3}=11.6$ Hz, H_{2ax}), 2.06(dddd, 1H, $J_{1eq,2eq}=2.2$, $J_{1ax,2eq}=13.0$, $J_{2eq,3}=5.1$ Hz, H_{2eq}), 2.6(ddd, 1H, $J_{4,5}=9.5$, $J_{4,5ax}=6.6$, $J_{4,5eq}=3.0$ Hz, H_4), 2.68(dt, 1H, $J_{1ax,1eq}=J_{1ax,2ax}=13.0$, $J_{1ax,2eq}=2.6$ Hz H_{1ax}), 3.06(ddd, 1H, $J_{1ax,1eq}=13.0$, $J_{1eq,2ax}=4.5$, $J_{1eq,2eq}=2.2$ Hz H_{1eq}), 3.24(dd, 1H, $J_{3,4}=9.2$, $J_{4,5}=9.5$ Hz, H_4), 3.6(ddd, 1H, $J_{2ax,3}=11.6$, $J_{2eq,3}=5.1$, $J_{3,4}=9.2$ Hz, H_3), 3.7(dd, 1H, $J_{5,6ax}=6.6$, $J_{6ax,6eq}=11.7$ Hz, H_{6ax}), 3.92(dd, 1H, $J_{5,6ax}=3.0$, $J_{6ax,6eq}=11.7$ Hz, H_{6eq}); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 35.4(C_2), 45.3(C_1), 63.5(C_5), 64.6(C_6), 82(C_3); FABMS(glycerol matrix) m/z 148(M+1); Anal ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_3$) C,H,N

이상의 spectral data와 문헌에 발표된 spectral data(Asano 등, 1995)가 일치하였으므로 compound V를 fagomine으로 동정하였다.

화합물 VI

백색의 침상결정으로 BuOH:EtOH:Water=2:10:3 전개용매 조건에서 R_f 치가 0.72였고 m.p 115°, 분자량 133이었다.

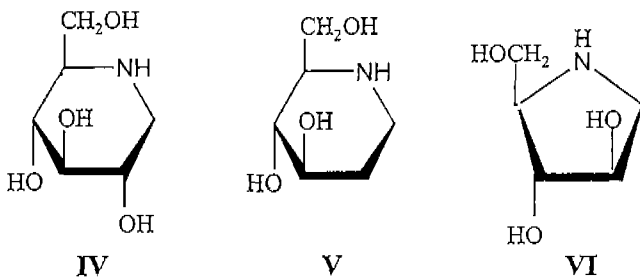


Fig. 1. Structures of compound IV, V and VI.

NMR, FABMS 및 원소분석 결과는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 3.45(dd, ^1H , $J_{1\text{ax},1\text{eq}}=12.1$, $J_{1\text{ax},2}=4.0$, $J_{1\text{eq},2}=4.0$ Hz, $\text{H}_{1\text{ax}}$), 3.67(ddd, 1H , $J_{3,4}=5.5$, H_4), 3.73(dd, 1H , $J_{1\text{ax},1\text{eq}}=1.21$, $J_{1\text{eq},2}=5.8$ Hz, $\text{H}_{1\text{eq}}$), 3.95(dd, 1H , $J_{5\text{ax},5\text{eq}}=11.7$, $J_{4,5\text{ax}}=6.3$ Hz, $\text{H}_{5\text{ax}}$), 4.0(dd, 1H , $J_{4,5\text{eq}}=4.8$, $J_{5\text{ax},5\text{eq}}=11.7$ Hz, $\text{H}_{5\text{eq}}$), 4.2(dd, 1H , $J_{3,4}=5.5$, $J_{2,3}=3.7$ Hz, H_3), 4.45(ddd, 1H , $J_{1\text{ax},2}=4.0$, $J_{1\text{eq},2}=5.8$, $J_{2,3}=3.7$ Hz, H_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 52.7(C_1), 61.6(C_4), 69.3(C_3), 76.9(C_2), 78.4(C_5); FABMS(glycerol matrix) m/z 134($\text{M}+1$); Anal ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$) $\text{C}, \text{H}, \text{N}$

이상의 spectral data를 참고로하여 compound VI를 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol으로 동정하였다(Asano 등, 1995).

이상 세 화합물에 대한 화학구조는 Fig. 1과 같다.

화합물 I-VI의 glycosidase 저해활성

본 실험에서는 누에오줌으로부터 분리한 6가지 화합물의 α -glucosidase, α -mannosidase, β -galactosidase, β -glucosidase에 의해 매개되는 효소반응에 대한 저해활성의 유무 및 크기를 측정해 보았다.

Table I은 각 화합물의 mammalian α -glucosidase 대한 저해활성을 측정한 실험 결과이다. 화합물 IV(1-deoxynojirimycin)는 흰쥐 소장내 α -glucosidase에 대해 가장 큰 저해활성을 나타낸 반면 화합물 II와 III은 저해활성을 보이지 못했다. 화합물 V(fagomine)는 1-deoxynojirimycin의 2-deoxy 유도체로서 소장내 α -glucosidase에 대한 저해활성이 1-deoxynojirimycin에 비해 1000배 이상 낮은 것으로보아 C-2 위치에 deoxygenation은 흰쥐 소장내 α -glucosidase 저해활성의 감소를 초래함을 알 수 있었다. 화합물 VI(1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol)의 경우는 fagomine보다는 크지만 1-deoxynojirimycin에 비해서는 적은 효소저해 활성을 보이고 있고, 특이한 사실은 isomaltase에 대한 저해활성이 maltase나 sucrase에 비해 10배 그리고 20배 이상씩 큰 선택성을 나타내고 있다. 화합물 I의 경우는 maltase에 대해서 보다 선택적인 저해활성을 보인 것 외에는 흰쥐 소장내 α -glucosidase에 대한 저해활성 정도는 fagomine과 유사하였다. 한편 간조직내 소포체의 glucosidase II에 대해서 Asano 등(1994)과

Table I. Concentration of compound I-VI (μM) giving 50% inhibition of mammalian α -glucosidases^a

Compd	α -glucosidase			
	Rat intestine			Rat liver
	Maltase	Isomaltase	Sucrase	ER ^b glucosidase
I	4	330	200	ni ^c
II	ni	ni	ni	ni
III	ni	ni	ni	ni
IV	0.2	0.2	0.3	ni
V	600	320	200	ni
VI	60	4.2	90	ni

^aMaltase, isomaltase and sucrase were colorimetrically assayed by the D-glucose oxidase-peroxidase method using maltose, isomaltose and sucrose, respectively, as substrate. ER glucosidase II activity was colorimetrically determined using ρ -nitrophenyl α -D-glucopyranoside as substrate. ^bER=endoplasmic reticulum. ^cni=less than 50% inhibition at 1000 μM .

Albein(1991)은 화합물 IV, V, VI 모두 저해활성이 있다고 보고한 반면(각 화합물의 IC_{50} 치는 4.6, 840, 20 μM) 본 실험에서는 세 화합물 모두 뚜렷한 효소저해활성을 나타내지는 못하였다.

Table II는 각 화합물의 흰쥐 그리고 jack bean α -mannosidase 대한 저해활성을 측정한 실험 결과이다. 소포체내 mannosidase는 oligosaccharide processing의 초기 단계에 관여하는 효소로서(Bishoff와 Kornfeld, 1986), 흰쥐 간조직내 소포체나 라이조좀에 있는 α -mannosidase에 대해 우리가 분리한 6개 화합물 모두 뚜렷한 저해활성을 나타내지 못한 반면 Asano 등(1994)은 화합물 IV와 VI의 IC_{50} 치가 1000, 110 μM 이라고 보고해 실험결과에 차이가 있다. 이 결과에서 mannosidase에 가장 큰 저해활성을 나타낸 화합물은 화합물 VI로, Fleet 등(1985)은 jack bean mannosidase에 대한 화합물 IV의 IC_{50} 치가 100 μM 이라고 보고한 바 있고 본 연구의 결과(32 μM)와 비슷하다.

Table II. Concentration of compound I-VI (μM) giving 50% inhibition of α -mannosidases^a

Compd	α -mannosidase		
	Rat liver		Jack bean
	ER ^b	Lysosomal	Mannosidase
I	ni	ni	ni ^c
II	ni	ni	ni
III	ni	ni	ni
IV	ni	ni	122
V	ni	ni	ni
VI	ni	ni	32

^aMannosidase activity was colorimetrically determined using ρ -nitrophenyl α -D-mannopyranoside as substrate. ^bER=endoplasmic reticulum. ^cni=less than 50% inhibition at 1000 μM .

Table III. Concentration of compound I-VI (μM) giving 50% inhibition of mammalian β -galactosidases^a

Compd	β -galactosidase		
	Rat intestine lactase	Rat liver lysosomal	Bovine liver lysosomal
I	300	ni ^b	13
II	ni	ni	ni
III	ni	ni	ni
IV	0.5	ni	ni
V	20	ni	ni
VI	180	ni	ni

^aLactase were colorimetrically assayed by the D-glucose oxidase-peroxidase method using lactose as substrate. Other enzyme activities were colorimetrically determined using *p*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside as substrate. ^bni=less than 50% inhibition at 1000 μM .

Table III은 각 화합물의 mammalian β -galactosidase 대한 저해활성을 측정된 실험 결과이다. 6개 화합물 모두 흰쥐와 소 간의 라이조솜 β -galactosidase에 대해서 저해활성이 거의 없었던 반면 흰쥐 소장내 lactase 효소 반응에 대해서는 화합물 IV, V, VI, I의 순으로 저해활성을 나타내었다. 결과에서 보듯이 pyranoside 유도체인 1-deoxynojirimycin과 fagomine이 furanoside 유도체인 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol보다 lactase에 대해 저해활성이 크음을 알 수 있었고 2번 탄소에 deoxygenation이 되면 저해활성이 α -glucosidase의 경우와 마찬가지로 작아짐을 알 수 있다.

Table IV는 각 화합물의 β -glucosidase 대한 저해활성을 측정된 실험 결과이다. 흰쥐 소장내 trehalase에 대해서는 화합물 VI가 가장 큰 활성을 나타낸 반면 cellobiase에 대해서는 어느 화합물도 저해활성을 나타내지는 못 하였다. 반면 almond β -glucosidase에 대해서는 화합물 I, IV, VI 그리고 V의 순으로 저해활성을 나타내었다. C-2 위치에 deoxygenation된 fagomine의 경우는 1-deoxynojirimycin과 비교 시 β -galactosidase와 β -glucosidase 효소반응에 작은 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다.

본 연구에서 분리된 6개의 화합물들은 다른 중에서 유래된 glycosidase에 대해서, 또한 같은 세포내의 다른 glycosidase에 다양한 형태로 저해작용을 나타냄을 알 수 있다. 6개 화합물중 1-deoxynojirimycin과 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol은 다른 화합물에 비해 α -mannosidase를 제외한 세종류의 glycosidase에 대해 높은 저해활성을 나타내었다. Asano 등이 *Morus bombycis*의 잎에서 분리한 1-deoxynojirimycin과 이의 배당체 수득율은 0.17%이며 fagomine과 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol의 수득율은 0.02%와 0.004%이다. 따라서 이들간의 비율은 17:2:0.4인 반면 누에 오줌에서 분리한 이들간의 비율은 화합물 VI의 수득율을 기준으로 할 때 26:0.7:0.4이다. 누에오줌의 glycosidase 저

Table IV. Concentration of compound I-VI (μM) giving 50% inhibition of β -glucosidases^a

Compd	Trehalase	β -glucosidase	
	Rat intestine	Rat intestine cellobiase	Almond
I	ni	ni ^b	6.6
II	ni	ni	ni
III	ni	ni	ni
IV	490	ni	38
V	ni	ni	120
VI	40	ni	48

^aTrehalase and cellobiase activities were assayed colorimetrically by the D-glucose oxidase-peroxidase method using trehalose and cellobiose, respectively, as substrate. Almond β -glucosidase activity was colorimetrically determined using *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside as substrate. ^bni=less than 50% inhibition at 1000 μM .

해작용이 *Morus bombycis* 잎에서 유래된 성분들에 의해 나타난 것이라고 가정할 때, glycosidase 저해활성이 deoxynojirimycin에 비해 상대적으로 적은 deoxynojirimycin 배당체들이 대사과정에서 당을 잃어 결과적으로 배당체 대부분이 1-deoxynojirimycin으로 대사된 것이 아닌가 추측된다. 이러한 추측은 누에오줌과 상엽의 물가용분획을 맥아당으로 부하한 마우스에 동일한 용량으로 투여시 누에오줌의 경우가 상엽보다 혈당상승 억제활성이 더 크다는 본 연구실의 실험결과와 일치한다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 농촌진흥청 주관 “농업특정연구개발사업” 연구비와 (주)상아제약 연구비에 의해 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

류강선, 정성현. (1998). 누에분말의 혈당강하 효과 pp. 69-70 “누에와 당뇨” 도서출판 신일상사, 서울.

Song, J. K. and Chung, S. H. (1998). Inhibitory effect of silkworm urine on the rat intestinal glycosidase. *J. Appl. Pharmacol.* **6**, 242-246.

Lee, J. S., Choi, M. H. and Chung, S. H. (1995). Blood glucose-lowering effects of Mori Folium. *Yakhak Hoeji* **39**(4), 367-372.

Asano, N., Oseki, K., Kizu, H. and Matsui, K. (1994). Nitrogen-in-the-ring pyranoses and furanoses: structural basis of inhibition of mammalian glycosidase. *J. Med. Chem.* **37**, 3701-3706.

Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. (1994). N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* **259**, 243-255.

- Asano, N., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. (1994). Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr. Res.* **253**, 235-245.
- Bishoff, J. and Kornfeld, R. (1986). The soluble form of rat liver α -mannosidase is immunologically related to the endoplasmic reticulum membrane α -mannosidase. *J. Biol. Chem.* **261**, 4758-4765.
- Card, P. J. and Hitz, W. D. (1985). Synthesis of 2(R), 5(R)-bis(hydroxymethyl)-3(R), 4(R)-dihydropyridine. A novel glycosidase inhibitor. *J. Org. Chem.* **50**, 891-893.
- Elbein, A. D. (1991). Glycosidase inhibitors: Inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. *FASEB J.* **5**, 3055-3063.
- Fleet, G. W. J., Nicolas, S. J., Smith, P. W., Evans, S. V., Fellows, L. E. and Nash, R. J. (1985). Potent competitive inhibition of α -galactosidase and α -glucosidase activity by 1, 4-dideoxy-1,4-imino-pentitols. *Tetrahedron Lett.* **26**, 3127-3130.
- Gruters, R. A., Neeffjes, J. J., Tersmette, M., de Goede, R. E. Y., Tulp, A., Huisman, H. G., Miedema, F. and Ploegh, H. L. (1987). Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase. *Nature* **330**, 74-77.
- Opheim, D. J. and Touster, O. (1978). Lysosomal α -D-mannosidases of rat liver. *J. Biol. Chem.* **253**(4), 1017-1023.
- Pan, Y. T., Hori, H., Saul, R., Sanford, B. A., Molyneux, R. J. and Elbein, A. D. (1983). Castanopermine inhibits the processing of the oligosaccharide portion of the influenza viral hemagglutinin. *Biochemistry* **22**, 3975-3984.
- Rhinehart, B. L., Robinson, K. M., LiU, P. S., Payne, A. J., Whetley, M. E. and Wagner, S. R. (1987). Inhibition of intestinal disaccharides and suppression of blood glucose by a new α -glycosidase inhibitor-MDL25,637. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**(3), 915-923.
- Tropea, J. E., Molyneux, R. J., Kaushal, G. P., Pan, Y. T., Mitchell, M. and Elbein, A. D. (1989). Australine, a pyrrolizidine alkaloid that inhibits amyloglucosidase and glycoprotein processing. *Biochemistry* **28**, 2027-2034.
- Tulsiani, D. P. R., Broquist, H. P. and Touster, O. (1985). Marked differences in the swainsonine inhibition of rat liver lysosomal α -D-mannosidase, rat liver Golgi mannosidase II and jack bean α -D-mannosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 427-435.
- Yagi, M., Kouno, T., Aoyagi, Y. and Murai, H. (1976). The structure of moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **50**, 571-572.