

대장균에서 4-nitroquinoline 1-oxide의 변이원성에 대한 속지황 물추출물의 항돌연변이 작용특성

안 병 용 · 한 종 현 · †최 동 성
원광대학교 한의학전문대학원, †우석대학교 생명공학부
(접수 : 2001. 9. 11., 게재승인 : 2001. 10. 18.)

Antimutagenic Mechanism of Water Extract from *Rehmannia glutinosa* Liboshitz on 4-nitroquinoline 1-oxide Induced Mutagenesis in *E. coli* B/r

Byung-Young Ahn, Jong-Hyun Han, and Dong-Seong Choi†
Professional Graduated School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea
†Division of Bioscience and Biotechnology, Woosuk University, Samrye, Jeonbuk 565-701, Korea
(Received : 2001. 9. 11., Accepted : 2001. 10. 18.)

The antimutagenic mechanism of the fraction III(RG-III) separated from the water extract of *Rehmannia glutinosa* was investigated by *Escherichia coli* GW and B/r strains. RG-III treatment did not affect the β -galactosidase activity of *E. coli* GW1060, 1103, 1107 and 1105. These results indicated that RG-III did not induce RecA protein amplification and did not also prevent the proteolytic cleavage of LexA. The bio-antimutagenicity and survival effect of RG-III on 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO), *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine(MNNG) were investigated by *E. coli* B/r strains which have different pathway of DNA repair. RG-III slightly increased the survival of 4NQO-treated WP2, WP2s, WP67, CM561, CM611 cells, but the reactivation of survival cannot be explained by the repair mode. RG-III caused the decrease of mutagenicity and lethality treated with MNNG in ZA159 despite of the increase in WP2, WP2s, WP67, CM561, CM611. Compared with bio-antimutagenic effects of RG-III on 4NQO, greatly increased antimutagenic effects of RG-III were observed with all the *E. coli* B/r strains tested, but less active in ZA159. These results suggest that RG-III was identified as a blocking agent for preventing the 4NQO induced mutagenesis, and may act as *chl*-products.

Key Words : bio-antimutagenic effect. 4NQO, viability, blocking agents

서 론

저자들은 SOS Chromotest를 이용한 *E. coli* PQ37에서 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)에 대한 속지황 물 추출물로부터 분리된 fraction III(RG-III)의 세포내 항돌연변이 효과를 보고하였다(1). 이러한 RG-III의 세포내 항돌연변이 효과는 1) 오류경향 SOS 수복의 충실도 증가, 2) 절제, 재조합 및 부정합 수복과 같은 오류가 없는 DNA 수복의 증가, 3) 세포내·외에서 변이원의 소거 및 차단, 또는 이들 요인의 상호작용에 의한 결과일 것으로 추정하였다. SOS 반응은 *recA*, *lexA*에 의해 상호적으로 조절되며 또한 SOS 반응의 유도시

RecA 단백질은 LexA 산물을 분해하기 때문에 RecA 단백질이 적당한 effector와 결합될 경우 SOS 반응이 억제되어 위양성(false positive)의 돌연변이원성을 나타낼 수 있다(2). 이와 같은 위양성 항돌연변이 효과가 *Polygonatum radix*의 추출물에 의해 나타남이 밝혀진 바 있으며(3), cinnamaldehyde(4), vanillin(5), sodium selenite(6) 등은 진정한 세포내 항돌연변이원성 물질로 동정되어져 있다. 항돌연변이원성은 변이원성 유도시스템에 따라 달라지므로 DNA 수복의 경로가 다른 여러 변이주를 사용하여 세포내 항돌연변이원성에 대한 메커니즘을 해석할 수 있다. 따라서 SOS Chromotest에서 나타난 RG-III의 세포내 항돌연변이 효과의 기구를 규명하기 위해서는 세포적 시스템이 다른 다양한 균주를 이용한 연구가 요망된다 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 RG-III가 SOS 반응의 유도를 저해하였는지를 조사하였고, 또한 4NQO에 대한 세포내 항돌연변이 기작을 해석하고자 DNA 수복의 경로가 다른 *E. coli* B/r

†Corresponding Author : Division of Bioscience and Biotechnology,
Woosuk University, Samrye, Jeonbuk 565-701, Korea
Tel : +82-63-290-1430, Fax : +82-63-291-9312
E-mail : dschoi@woosuk.ac.kr

변이주들을 사용하여 4NQO와 MNNG(*N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine)에 대한 항돌연변이원성 및 생존효과를 조사하여 RG-III의 항돌연변이원성의 기작을 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 숙지황은 전북 익산시 소재 유한의원에서 기증 받아 사용하였으며 4-nitroquinoline-oxide(4NQO), *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine(MNNG)는 Fluca(Switzerland) 회사로부터 구입하였다.

시험균주

E. coli B/r 및 *E. coli* GW는 Akanuma 박사(잔류농약연구소, Japan)와 Bagg 박사(Cambridge 대학, U.S.A)로부터 기증 받았으며 각 균주의 유전자 특성은 Table 1과 같다.

활성분획 정제

분쇄된 숙지황 시료에 10배(w/v) 량의 증류수를 가하여 수욕상에서 환류 냉각하면서 2회 추출한 후 여과 및 동결건조하여 물추출물로 사용하였다. RG-III의 분획은 Ahn 등의 방법(1)으로 제조하였다.

Rec-lex test

Nunoshiba와 Nishioka(7)의 방법을 보완하여 수행하였으며 β -galactosidase를 정량하여 분석하였다. *E. coli* GW를 LB 배지(bacto tryptone 10 g, bacto yeast extract 5 g and NaCl 10 g per liter [pH 7.2 at 25°C])에서 110 rpm으로 10시간 진탕 배양(30°C)하여 종배양액을 얻었다. 이 종배양액을 2%(v/v)가 되도록 LB 배지에 접종하고 대수증식기(2×10^6 cfu/mL)에 도달하도록 30°C에서 210 rpm으로 약 3시간 동안 배양하였다. β -galactosidase를 유도시키기 위해 *E. coli* GW1060, 1103은 42°C에서 210 rpm으로 60분간 1차 배양한 다음, 30°C에서 210 rpm으로 60분간 2차 배양하였으며, *E. coli* GW1105, 1107은 30°C에서 210 rpm으로 120분간 연속 배양하였다. 배양종료 후 β -galactosidase 측정법은 Miller의 방법(8)으로 측정하였으며 효소활성은 다음 식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{Enzyme activity} = 1000 \times \frac{O.D_{400} - 1.75 \times O.D_{550}}{T \times V / 2.0 \times O.D_{660}}$$

T: reaction time(min), V: sample volume(mL)

Rec-lex test에서 RG-III의 작용 시험은 2차 배양전에 배양액 1 mL당 200 mg 농도의 RG-III 분획물 50 μ L을 5 mL의 본 배양에 첨가하여 β -galactosidase 활성을 비교 분석하였다. β -galactosidase 활성 비율은 [양성대조구의 β -gal(units) / 시료를 첨가하였을 때 β -gal(units)]으로 계산하였다.

E. coli B/r에서 항돌연변이원성 및 생존력 시험

항돌연변이원성 시험 및 생존력 시험은 Ohta 등의 방법(5)을 이용하였으며, 먼저 농도에 따른 변이원의 용량반응과 치사조건 시험을 수행하여 변이원의 유도특성과 최적농도를 설정하였다. 항돌연변이원성 시험은 L-tryptophan (L-tryptophan 5 mg per top agar 50 mL)이 함유된 2 mL의 top agar(agar 6 g, NaCl 5 g per litre, 45°C)에 변이원이 처리된 후 세척된 균 현탁액 200 μ L와 300 μ g/mL 농도의 시료액 50 μ L를 혼합하여 3초간 진탕 교반한 다음 Vogel-Bonner medium (VBM; agar 15 g, 50 \times VB salt[MgSO₄·7H₂O 10 g, citric acid monohydrate 100 g, K₂HPO₄ 50 g, Na₂(NH₄)PO₄ 175 g in warm D.W(45°C) 670 mL] 20 mL, glucose 4 g per liter) 상에 주입 도포하였다. 37°C에서 48시간 배양하여 이때 생성된 콜로니(trp⁺ revertants) 수를 계수하여 항돌연변이원성을 판정하였다. 항돌연변이원성은 [(M-S₁/M-S₀) \times 100]으로 계산하였고 돌연변이 물질만 존재한 경우의 복귀 돌연변이 수는 M, 자연복귀 돌연변이 수는 S₀, 돌연변이원과 시료를 첨가하였을 경우의 복귀 돌연변이 수는 S₁로 나타내었다.

변이원의 농도에 따른 치사조건 시험은 1~20%의 생존을 나타내는 변이원의 농도를 설정하기 위하여 시행하였다. 즉 4.5 mL의 66 mM phosphate buffer (pH 7.2)에 0.5 mL의 균 부유액을 10⁶배까지 희석하고, 각 희석배수의 균 현탁액 100 μ L을 취하여 2 mL의 top agar에 붓고 3초간 진탕 교반한 다음, Vogel-Bonner nutrient agar plate (VBNM; agar 15 g, 50 \times VB salt 20 mL, glucose 4 g, Oxoid nutrient broth No.2 50 mL per liter) 상에 주입 도포하였다. 37°C에서 24시간 배양하여 이 때 생성된 콜로니의 수를 계수하였다. 생존력 증가 시험은 변이원의 농도에 따른 생존 시험 과정과 동일하게 시행하였으나, 1~20% 생존을 나타내는 농도의 변이원을 처리하였

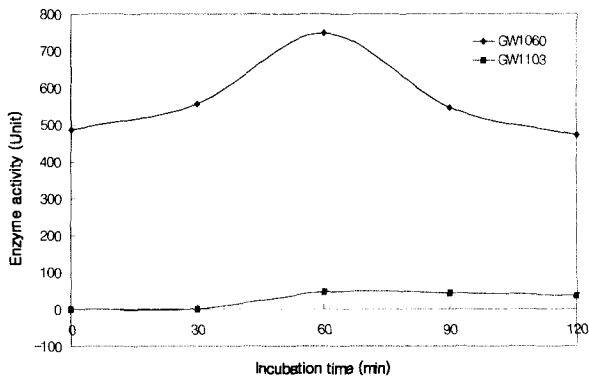
Table 1. Genetic characteristics of bacterial strains used

Strain	Genotypes	Reference
GW1060	<i>uvrA215::Mud</i> (Ap lac), <i>cts recA441(tif-1)</i>	Wang and Jiang (1991)
GW1103	<i>umuC::Mud</i> (Ap lac), <i>cts recA441(tif-1)</i>	Wang and Jiang (1991)
GW1107	as GW 1103, also <i>uvrA⁺ lexA51</i> (Def)	Wang and Jiang (1991)
GW1105	as GW1103, also <i>uvrA⁺, malE::Tn5, lexA3</i> (Ind ⁺)	Wang and Jiang (1991)
WP2	<i>trpE65, malB15, ion-11, sulA1</i>	Ohta et al (1983)
WP2s	as WP2, also <i>uvrA155</i>	Ohta et al (1983)
WP67	as WP2, also <i>uvrA155, polA1</i>	Ohta et al (1983)
CM561	as WP2, also <i>lexA102 malB⁺</i>	Ohta et al (1983)
CM611	as WP2, also <i>uvrA155, lexA102 malB⁺</i>	Ohta et al (1983)
ZA159	as WP2, also <i>uvrB, Δchl</i>	Ohta et al (1983)

Table 2. Effects of the RG-III separated by sephadex LH-20 of aqueous fraction from *Rehmannia glutinosa* on SOS responses in *E. coli* GW strains

Strain	RG-III	Cell density		β -galactosidase		Ratio
		O.D ₆₆₀	O.D ₅₅₀	O.D ₄₄₀	Units	
GW1060	control	0.557	0.028	0.311	470.3	0.987
	-	0.347	0.023	0.345	878.2	
	+	0.349	0.019	0.338	873.2	
GW1103	control	0.553	0.025	0.055	6.8	1.027
	-	0.410	0.025	0.138	78.3	
	+	0.445	0.025	0.151	80.3	
GW1107	control	0.438	0.029	0.411	822.5	1.030
	+	0.500	0.031	0.478	847.0	
GW1105	control	0.493	0.020	0.037	2.7	0.978
	+	0.504	0.024	0.044	2.7	

Incubation times for enzyme induction were 10(GW1060, 1107), 15(GW1105) and 30(GW 1103) minutes, respectively. The concentration of fraction III is 200 μ g/mL.

**Figure 1.** Kinetics of β -galactosidase in *E. coli* GW1060 and 1103. Blank was incubated at 30 $^{\circ}$ C for 2 hours.

다. 단 4NQO에 대한 치사력이 강한 WP2의 경우는 20% 이상의 생존율을 나타내는 농도에서 시험하였다. 2 mL의 top agar에 300 μ L/mL의 농도의 시료액 50 μ L을 혼합하여 3초간 진탕 교반한 다음 Vogel-Bonner nutrient agar plate (VBNM; agar 15 g, 50 \times VB salt 20 mL, glucose 4 g, Oxoid nutrient broth No.2 50 mL, per liter) 상에 주입 도포하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였다. 이때 생성된 콜로니를 계수하였다.

결과 및 고찰

SOS response에서 RG-III의 작용 특성

저자들은 SOS Chromotest에서 RG-III는 RecA 효소의 활성을 억제하거나 LexA repressor 분해할 가능성을 제기한 바 있다(1). 따라서 SOS 반응에 대한 RG-III의 기작을 자세히 연구하고자 *E. coli* GW series를 사용하여 β -galactosidase 활성을 조사하였다. 먼저 heat shock에 따른 β -galactosidase kinetics를 분석하고자 42 $^{\circ}$ C에서 30분 간격으로 β -galactosidase의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Figure 1과 같다. GW1060 및 1103에서 효소활성의 최적시간은 60분으로 평가되었고, 120분에서는 각각 37.1, 17.7%의 감소율을 나타내었다. GW1103 (*umuC::Mud*)에 비해 GW1060 (*uvrA::Mud*)에서 SOS 반응이 고발현한 결과는 SOS 반응이 유도되지 않아도 절제

수복은 발현되며 *umuC* 의존성 SOS 수복은 긴급한 상황에서만 유도됨을 시사하고 있다. GW1107(*lexA*)은 SOS 반응의 repressor인 *lexA* 유전자가 결실된 균주로 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양한 결과 예상대로 SOS 반응이 항구적으로 유도됨을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2에 나타난 바와 같이 200 μ g/mL 농도의 RG-III를 첨가할 경우 온도변화에 의한 GW1060 및 1103의 SOS 반응을 억제하지 못하는 RG-III가 RecA 효소의 활성을 차단시키지 않는 것으로 판단된다. RG-III에 의해 GW1107의 효소활성이 저해되지 않는 것은 SOS반응의 억제제인 LexA의 작용에 관여하지 않음을 시사한다. 또한 GW1105에서도 아무런 영향을 미치지 못하였으므로 LexA 단백질이 분해되는 과정에도 관여하지 않음을 알 수 있었다. 결론적으로 RG-III는 SOS 두가지 기능의 발현을 차단하지 못하였으므로 SOS Chromotest에서 RG-III의 세포내 항돌연변이 활성은 세포내에서 DNA의 손상을 차단하거나 수복을 돕는 과정에 작용했을 것으로 해석된다.

변이원의 농도에 따른 돌연변이원성 및 치사농도 설정

변이원은 DNA adducts나 DNA strand break을 일으키는 양식이 다르고, 동일한 변이원일지라도 세포내 반응에 따라 변이원성은 다르게 나타난다(9). 그러므로 항돌연변이원성을 정확하게 해석하기 위해서는 이미 그 기능이 밝혀진 변이원과 변이균주를 이용하여 그 연관성을 해석해 볼 필요가 있다. 따라서 *E. coli* B/r를 이용하여 4NQO, MNNG에 의한 돌연변이원성 최적농도와 균주 치사농도를 시험한 결과는 Table 3 및 Figure 2와 같다. Table 3에 있어서 WP2s의 경우, WP2에 비해 4NQO로 유도된 변이원성은 뚜렷하게 증가된 반면 생존력은 감소되었으며, MNNG의 변이원성에 대해서는 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 Quillardet와 Hofnung(10)이 PQ37 (*uvrA*)과 PQ35(*uvrA*⁺)를 이용한 4NQO, MNNG의 유도 지수(IF)를 비교한 결과와 일치하였다. *uvrA*를 포함하는 절제 수복은 SOS 반응 유도 이전에도 발현되며, SOS 반응이 유도된 상태에서도 가장 먼저 발현하여 오류가 없는 완벽한 수복을 유도한다(12). 또한 4NQO에 의한 돌연변이는 *umuC* 의존성 오류경향 SOS 수복(*umuC*-dependent error-prone SOS

Table 3. The optimal concentration for antimutagenic and survival test in *E. coli* B/r strains

Strain	Mutagen	Con.(μ g)/plate		Revertants	Viable cells
		revertants	viable cells.		
WP2	4NQO	80.0	160.0	175	7.0×10^8
	MNNG	3.0	80.0	900	1.0×10^8
WP2s	4NQO	2.0	4.0	1,000	0.8×10^8
	MNNG	3.0	60.0	980	1.0×10^8
WP67	4NQO	2.0	4.0	912	1.5×10^8
	MNNG	2.0	4.0	141	1.5×10^8
CM561	4NQO	~10.0	20.0	no growth	3.0×10^7
	MNNG	4.0	10.0	600	4.0×10^7
CM611	4NQO	~120.0	1.0	no growth	1.5×10^8
	MNNG	4.0	8.0	450	1.5×10^8
ZA159	4NQO	2.0	4.0	895	2.0×10^8
	MNNG	3.0	60.0	900	1.0×10^8

Optimal doses of mutagen for mutagenesis are the concentration that forms about 600~900 revertants per plate. Optimal doses of viable cell are that forms about 1~20% of optimal mutagen-treated revertants. Each value represents mean of triplicate plates. Each experiment was repeated 3 times.

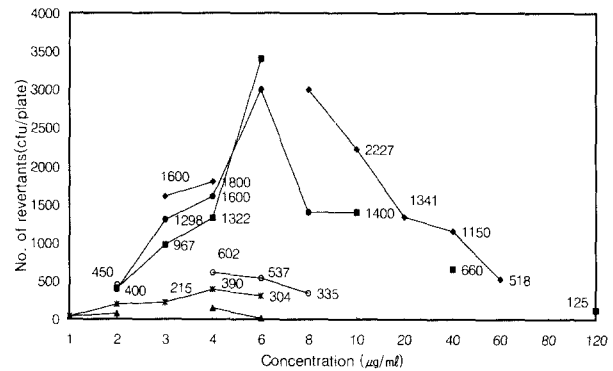
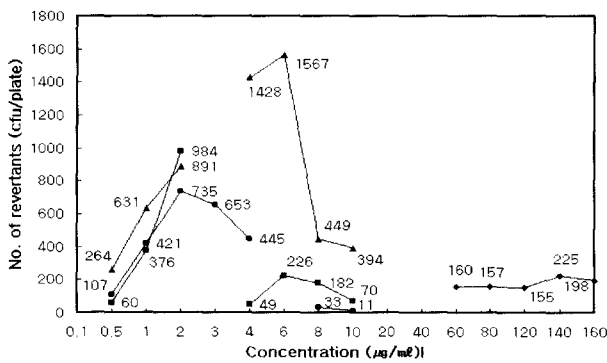


Figure 2. Number of revertants induced by 4-NQO and MNNG in *E. coli* B/r (-◆- : WP2, -■- : WP2s, -▲- : WP67, -○- : CM561, -×- : CM611, -●- : ZA159).

repair)을 통해 유도되기 때문에(11), WP2에서는 *umuC* 의존성 오류경향 SOS 수복이 일어나기 전 절제수복에 의해 4NQO의 돌연변이를 차단하였으며, MNNG에 의해 생성된 3-alkyladenine은 절제수복에 의해 효과적으로 제거되지 못한 결과로 해석할 수 있다. WP67(*polA*)의 경우, WP2s에 비해 MNNG로 유도된 변이원성이 감소되었다. *polA* 유전자는 DNA polymerase I의 합성을 조절하며 single strand gap을 연결시키는 기능을 갖는다(12). 따라서 *polA*가 결실된 균주는 알킬화로 인해 생성된 single strand break을 연결할 수 없기 때문에 MNNG에 의해 유도되는 돌연변이 수가 크게 감소된 반면, *uvrA* 이외의 *uvrB*, *C* 유전자에 의해 절제된 후 DNA polymerase I에 의해 single strand gap이 연결될 수 있는 WP2s에서는 돌연변이 수가 증가된 것으로 확인되었다. *lexA* 결실 균주인 CM561, 611의 경우, *LecA102*가 *RecA*에 의해 분해되지 않으므로 SOS 반응이 유도되지 않는다(13). 때문에 SOS 반응에 의존하는 4NQO의 경우 돌연변이가 유도되지 않았다(12). 이러한 결과는 4NQO에 의해 유도되는 돌연변이가 절제수복 기능 상실에 의해 영향을 받기보다는 SOS 오류경향 수복에 의해 영향을 받는 사실을 재확인한 결과이다.

Figure 2에서 CM611의 경우, 4NQO, MNNG의 치사력에

민감하였으며 이는 SOS 수복과 절제수복 시스템이 작동되지 않음을 의미한다. 또한 MNNG는 고농도에서 *lexA*-의존성 SOS 반응에 의해 돌연변이가 유도되기 때문에(14) MNNG에 의한 변이원성의 감소는 *lexA* 유전자 결실에 기인된 것으로 추정된다. ZA159는 WP2s와 유사한 결과를 나타내었다. 다만 *chl* 변이균주인 ZA159에서 4NQO로 유도된 돌연변이수가 약간 감소하였는데 이는 4NQO의 활성화에 *chl* 유전자가 반드시 필요한 것이 아니라고 한 Quillardet 등의 결과(15)와 유사하였다. *uvrB* 또한 *uvrA*와 같이 절제수복 시스템에 관련된 유전자임을 알 수 있었으며, *uvrA* 의존성 절제수복은 *uvrA* 단백질과 *uvrB*, *C*의 산물이 결합될 경우 활성화된다는 Kenyon과 Walker(16)의 연구결과를 뒷받침하는 실험결과로 해석될 수 있다. 이와 같은 결과들은 변이원에 대한 변이균주들의 돌연변이 유도가 정확하게 유도된 결과로써 세포내 항돌연변이 기작을 연구하기 위한 세균계 시스템이 구축된 것으로 사료되었다.

돌연변이 수복 및 생존력 증강에 대한 영향

SOS Chromotest에서 RG-III의 세포내 항돌연변이 효과에 관한 수복 기작을 해명하기 위하여 DNA 수복의 경로가 다

Table 4. Effect of RG-III on cellular viability and antimutagenicity of *E. coli* B/r strains after treatment with 4NQO and MNNG

Strain	Mutagen			RG-III (300 µg/plate)	Revertants (inhibition rate, %)	Viable cells
	muta-gens	rev. (µg/plate)	via.			
WP2	spontaneous				2	1,050 × 10 ⁶
	4NQO	80.0	160.0	-	156	70
				+	136 (13)	81
	MNNG	1.5	80.0	-	320	132
			+	333 (-5)	118	
WP2s	spontaneous				11	1,090 × 10 ⁶
	4NQO	2.0	4.0	-	943	81
				+	1001 (-6)	97
	MNNG	1.5	60.0	-	151	181
			+	176(-12)	177	
WP67	spontaneous				2	800 × 10 ⁶
	4NQO	2.0	4.0	-	660	156
				+	664 (0)	184
	MNNG	1.5	4.0	-	80	80
			+	86 (-8)	77	
CM561	spontaneous				2	960 × 10 ⁶
	4NQO		20.0	-		26.1
				+		28.1
	MNNG	2.0	10.0	-	230	37.0
			+	237 (-3)	32.6	
CM611	spontaneous				7	1,030 × 10 ⁶
	4NQO		0.5	-		181
				+		205
	MNNG	2.0	8.0	-	310	158
			+	342(-11)	138	
ZA159	spontaneous				14	800 × 10 ⁶
	4NQO	2.0	4.0	-	283	202
				+	280 (0)	201
	MNNG	1.5	60.0	-	244	115
			+	205 (17)	150	

rev.; revertants, via.; viable cells. Each value represents mean of triplicate plates. Each experiment was repeated twice.

른 여러 변이주를 사용하여 4NQO와 MNNG에 대한 세포내 항돌연변이원성과 치사에 대한 생존효과를 조사하였다. SOS 수복은 손상된 세포가 생존하기 위해서 긴급 수복하는 오류 경향 수복계이므로(17) SOS 수복이 차단되면 생존균수는 감소할 것이다. 그러나 RG-III를 첨가하였을 경우에 4NQO로 처리된 균주들의 생육은 미미하게 증가되었다(Table 4). 따라서 RG-III의 항돌연변이원성은 SOS 수복 저해효과에 기인된 결과가 아님을 재확인할 수 있었다. 4NQO를 처리한 후 top agar에 300 µg/mL 농도의 RG-III를 첨가하였을 경우, WP2 (DNA repair proficient strain)는 13%의 세포내 항돌연변이 효과를 나타낸 반면 WP2s(*uvrA*), WP67(*uvrA*, *polA*), ZA159 (*uvrB*, *chl*)에서는 세포내 항돌연변이원성이 나타나지 않았다.

4NQO의 변이원성 유도에는 nitroreductase 영향을 받지 않으므로(15), RG-III가 ZA159(*uvrB*, *chl*)를 제외한 균주에서 *chl* 유전자 산물(nitrate reductase)의 억제제나 촉매제로 작용하여 4NQO로 유도된 변이원성에 미칠 영향은 배제되었을 것이다. 그럼에도 불구하고 WP2 및 WP2s(*uvrA*), WP67(*uvrA*, *polA*), CM561(*lexA*), CM611 (*uvrA*, *lexA*) 변이주에서 생존균수는 증가되었기 때문에 4NQO에 대한 생존균수의 증가는 DNA 수복에 의한 것이 아님을 알 수 있다. 다만 야생주인 WP2에서 미약하나마 세포내 항돌연변이 효과를 나타낸 결과는 *uvrA* 유전자의 작용을 활성화시키는 *uvrB*의 산물의 cofactor로 작용함으로써 나타난 결과일 가능성이 있으나, 수복계의 증진으로 인한 효과가 배제되었으므로 *uvrB*의 기능에 의한 결과

Table 5. Comparison of antimutagenic effects of RG-III against 4NQO in *E. coli* WP strains

Strain	Spontaneous	Revertants		Inhibition rate(%)
		Control(+)	RG-III	
WP2 (80) ¹⁾	2	166±3	72±1	57
WP2s (2)	11	620±2	93±22	87
WP67 (2)	2	827±6	208±2	75
ZA159 (2)	12	751±10	405±1	47

Each value represents mean±S.D. of triplicate plates. Each experiment was repeated twice. The 5 mL of main cultured broth washed twice with 0.066 M phosphate buffer(PB) and resuspended in PB(5 mL). 300 µg/mL of RG-III was incorporated into each 2 mL portion of bacterial suspensions treated 4NQO at the same time and incubated at 37°C for 30 minutes with 210 rpm shaking. Treated(4NQO) and incorporated(4NQO plus RG-III) cells were washed twice with PB and resuspended in 2 mL of PB. The suspension solutions(200 µL) obtained were plated on VBM to count revertants. ¹⁾concentration of mutagen(µg/mL)

일 가능성도 희박하다. 또한 *E. coli* PQ37에서 강한 세포내 항돌연변이 활성이 *E. coli* B/r균주에서는 나타나지 않았다. 이에 대한 원인은 첫째 DNA 손상과 중간단계의 돌연변이를 일으켜 시험하는 SOS Chromotest에서 세포내 돌연변이와 DNA 손상이 고정된 돌연변이에서의 세포내 항돌연변이원성 차이, 둘째 *rfa* 유전자의 존재 유무에 따른 세포막 조성의 차이에 의한 결과로 추측할 수 있다.

4NQO와 300 µg/mL 농도의 RG-III를 동시에 처리한 경우, 시험한 모든 균주에서 세포의 항돌연변이는 뚜렷하게 증가되었으며, 특히 고농도(80 µg/mL)의 4NQO로 유도된 WP2에서 57%의 세포의 항돌연변이원성을 나타내었다(Table 5). 동일한 농도(2 µg/mL)의 4NQO에 의해 유도된 변이원성에 대하여 ZA159는 WP2s, WP67보다 낮은 억제활성(Table 5)을 보였는데, 이는 세포밖에서도 *chl* 유전자 산물이 RG-III의 돌연변이 억제효과에 영향을 미치는 것으로 해석된다. 160 µg/mL의 농도의 4NQO를 처리한 경우 WP2의 치사율이 약간 감소하였으나(Table 4), 300 µg/mL 농도의 RG-III와 80 µg/mL 농도의 4NQO를 동시에 처리한 경우 57%의 세포의 항돌연변이 효과를 나타내었다. 이러한 세포의 항돌연변이 효과는 RG-III와 4NQO의 병용처리에 의한 항균성에 기인하지 않았음이 시사되었다.

MNNG의 경우, RG-III는 ZA159(*uvrB*, *chl*)를 제외한 모든 실험 균주(*E. coli* B/r)에서 변이원성과 치사율을 미약하게 상승시켰으나, ZA159(*uvrB*, *chl*)에서는 17%의 세포내 항돌연변이 효과와 함께 생존력이 증가되었다(Table 4). 따라서 RG-III의 활성성분은 *chl* 유전자 산물과 같이 MNNG로부터 methyl diazonium hydroxide의 대사나 carbonium ion(CH₃⁺)과 친핵체의 결합(18)에 cofactor로 작용하여 염기의 알킬화 유발을 미약하게 촉진했을 가능성이 시사된다.

모든 결과를 종합해 볼 때 RG-III는 세포내·외에서 4NQO로부터 발생된 nitrenium ion(5)을 차단하거나 상쇄시키는 효과로 인해 4NQO의 치사력에 대해 생존력을 미약하게 증가시켰으며, *chl* 유전자 산물(nitrate reductase, formate dehydrogenase, biotin sulfoxide reductase, molybdenum-containing factor)(19)과 유사한 작용을 나타내는 것으로 사료된다

요 약

숙지황 물추출물로부터 분리된 fraction III(RG-III)의 항돌연

변이원성의 기작을 *E. coli* GW, B/r 균주를 이용하여 조사하였다. SOS 유도를 반영하는 β-galactosidase 활성이 *E. coli* GW1060, 1103, 1107, 1105에서 증가되지 않았다. RG-III는 RecA 단백질의 합성을 증폭시키거나 LexA 산물의 분해를 저해하지 않았으므로 SOS 두 기능의 발현에 영향을 미치지 못했다. 따라서 DNA 수복의 경로가 다른 *E. coli* B/r 변이주를 사용하여 4NQO와 MNNG에 대한 세포내 항돌연변이원성과 생존효과를 조사하였다. ZA159(*uvrB*, *chl*)를 제외한 WP2, WP2s, WP67, CM561, CM611에서 RG-III는 4NQO에 대한 생존력을 미약하게나마 증가시켰으나, 이러한 생존력 재활성을 수복모드에 의해 설명할 수는 없었다. WP2, WP2s, WP67, CM561, CM611에서, RG-III는 MNNG로 유도된 돌연변이원성과 치사율을 증가시키에도 불구하고 ZA159(*uvrB*, *chl*)에서는 감소시켰다. 4NQO에 대한 세포내 항돌연변이원성과 세포의 항돌연변이원성을 비교하였을 때 시험한 *E. coli* B/r 균주에서 4NQO의 변이원성을 두드러지게 억제하였으나 ZA159(*uvrB*, *chl*)에서는 상승효과가 상대적으로 감소되었다. 이러한 결과들은 RG-III가 4NQO의 변이원성을 방어하는 차 단계임을 시사하며, *chl* 산물의 기능과 유사한 작용을 하는 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 2001년도 우석대학교 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, B. Y., K. S. Lee, G. S. Song, I. K. Maeng, and D. S. Choi (1998), Bio-antimutagenic effects of water extract from *Rehmannia glutinosa* Liboschitz in SOS Chromotest. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 439-445.
- Kenyon, C. J., R. Brent, M. Ptashne, and G. C. Walker (1982), Regulation of damage-inducible gene in *E. coli*, *J. Mol. Biol.*, **160**, 445-457.
- Wang L. and Z. Jiang (1991), Inhibitory effects of chinese medicine on SOS responses in *E. coli* and their mechanism, *Acta Genetic Scinica*, **18**, 90-96.
- Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, and Y. Shirasu (1983), Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical mutagenesis in *E. coli*, *Mutation Res.*, **107**,

- 219-227.
5. Ohta, T., M. Watanabe, Y. Shirasu, and T. Inoue (1982), Post-replication repair and recombination in *uvrA umuC* strains of *E. coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound, *Mutation Res.*, **201**, 107-113.
 6. Sato, T., K. Chikuzawa., H. Yamamori., Y. Ose, H. Nagase, and H. Kito (1991), Evaluation of SOS Chromotest for the detection of antimutagens, *Environ. Mol. Mutagenesis.*, **17**, 258-263.
 7. Nunoshiwa, T. and H. Nishioka (1991), Rec-lac test for detecting SOS-inducing activity of environmental genotoxic substances, *Mutation Res.*, **254**, 71-77.
 8. Miller, J. H. (1972), Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, p352-355, Cold Spring Harbor, NY.
 9. Schendel, P. F., M. Defais, P. Jeggo, L. Samson, and J. Cairns (1978), Pathways of mutagenesis and repair in *E. coli* exposed to low level of simple alkylating agents, *J. Bacteriol.*, **135**, 466-475.
 10. Quillardet, P. and M. Hofnung (1985), The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, *Mutation Res.*, **147**, 65-78.
 11. Kato, T. and Y. Shinoura (1997), Isolation and characterization of mutants of *E. coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light, *Mol. Gen. Genet.*, **156**, 121-131.
 12. Bridges, B. A., R. P. Mottershead, H. L. Green, and W. J. H. Gray (1973), Mutagenicity of dichlorvos and methyl methanesulphonate for *E. coli* WP2 and derivatives deficient in DNA repair, *Mutation Res.*, **19**, 295-303.
 13. Bage, A., C. J. Kenyon, and C. Walker (1981), Inducibility of gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 5749-5753.
 14. Schendel, P. F and M. Defais (1980), The role of *umuC* gene product in mutagenesis by simple alkylating agents, *Mol. Gen. Genet.*, **177**, 661-665.
 15. Quillardet, P., J. Jenek, P. Demerseman, R. Royer, and M. Hofnung (1986), Genotoxic activity of two furan analogues of benzo(a)pyrene and their 2-nitro derivatives, *Mutation Res.*, **172**, 223-230.
 16. Kenyon, C. J. and G. C. Walke (1981), Expression of the *E. coli uvrA* gene is inducible. *Nature*, **289**, 808-810.
 17. Witkin, E. M. (1976), Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *E. coli*, *Bacteriol. Rev.*, **40**, 869-907.
 18. Gichner, T. and J. Veleminsky (1998), Mechanisms of inhibition of N-nitroso compounds -induced mutagenicity, *Mutation Res.*, **202**, 325-334.
 19. Bachmann, B. J. (1983), Linkage map of *E. coli* K-12, *Microbiol. Rev.*, **47**, 180-230.