

Supply of Tryptophan and Tryptamine Influenced the Formation of Melatonin in *Viola* Plants

Yeojae Kim, Young Ha Yoon and Woong June Park*

Department of Molecular Biology & Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Yongin 448-701, Korea

Received November 1, 2010 / Accepted January 4, 2011

Melatonin has been known as an animal hormone. However, melatonin exists in diverse organisms including higher plants. The biosynthesis and physiological roles for melatonin in plants is still largely unknown, although both dicot and monocot plants have melatonin and some medicinal plants even contain large amounts of melatonin. In this study we detected melatonin in diverse *Viola* plants, in which melatonin had not been examined so far, by reverse phase HPLC analysis, demonstrating the wide existence of melatonin in the genus of *Viola*. We then fed tryptophan (Trp) and tryptamine (TAM) to the incubation medium for *Viola* leaf sections to test their effects on melatonin formation. Trp is also the hypothesized starting material of melatonin in plants, and TAM is the following intermediate produced by the decarboxylation of Trp. Trp feeding did not affect the contents of melatonin. In contrast, TAM feeding clearly increased the level of melatonin in *Viola* leaves. Because TAM is derived from Trp, we concluded that the Trp-TAM pathway exists in *Viola* plants as well. Ineffectiveness of Trp feeding to the change of melatonin contents supports the hypothesis that the decarboxylation step from Trp to TAM is the rate-limiting step in plant melatonin biosynthesis.

Key words : Melatonin, tryptophan (Trp), tryptamine (TAM), *Viola* plants

서 론

멜라토닌은 동물의 송과선(pineal gland)에서 분비되어 일주기 변화 중 밤 신호(night signal)에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있으며[6], 이에 근거하여 불면증 치료에 사용되고 있다[7]. 멜라토닌은 그 외에도 항산화 작용[20], 항암[22], 통증의 제어[1], 대사의 조절[13] 등 다양한 작용을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 척추동물에서 작용이 가장 널리 알려져 있기는 하지만, 멜라토닌은 송과선이 없는 무척추동물[26], 쌍편모류[18], 조류[8], 식물[5,25] 등 매우 다양한 생물군에서도 발견되므로 멜라토닌은 진화 초기부터 획득된 조절물질인 것으로 사료된다. 식물에서 멜라토닌의 기능은 일주기 조절, 항산화 작용 등[16,19]일 것으로 예상하는 것이 일반적이다. 그러나, 옥신과 유사한 성장조절, 광합성이나 광에 의한 피해 방어[16,19,23] 등 동물과는 전혀 다른 기능을 수행할 가능성도 제시되어 있다.

동물에서 멜라토닌은 L-tryptophan (Trp)에서 시작하여 5-hydroxytryptophan, serotonin, N-acetyl-5-hydroxytryptamine을 거쳐 합성되는 것으로 알려져 있다[4]. 그러나 식물에서는 tryptophan decarboxylase (TDC)에 의하여 Trp이 TAM으로 전환되고 이것이 다시 hydroxylation 되면서 serotonin으로 전환되는 경로가 함께 작용하거나 오히려 더 우세

할 것으로 제안되었다[11,21]. 그러나 아직 식물에서 멜라토닌 생합성 경로가 완전히 증명되지 않는 못하였으며 제안된 생합성 경로를 지지하는 몇 건의 보고만이 있었을 뿐이다.

인돌 화합물 계열인 멜라토닌은 옥신[16], indole glucosinolate 및 camalexin [15] 등의 생합성 경로와도 중간 산물들을 공유하므로 Trp로부터 합성되는 물질들은 일종의 metabolic network을 형성하며 서로 균형을 이루고 있을 가능성이 큰 것으로 사료된다. 본 논문은 metabolic network의 평형 문제는 다루지 않고 melatonin의 관점에서 다루었으나 멜라토닌 생성의 중간산물들이 auxin 등 다른 물질의 합성에도 사용될 수 있다는 점을 밝혀두고자 한다.

식물에서 멜라토닌의 존재는 다양한 생물군에서 알려져 있지만[12,17,19] 특히 약용식물 중에서 함량이 높은 경우가 보고되었다[5]. 멜라토닌을 함유하는 것으로 알려진 식물 중에는 한국에 자생하는 식물들도 많이 포함되어 있으며 본 연구에서는 그 중에서 제비꽃속(*Viola*) 식물들에 주목하였다. *Viola*에 속하는 식물들은 국내에 최소 60종 이상이 자생하며 근연종인 이들 사이에 교배가 일어나 실제로는 잡종인 형태로 존재하는 경우가 많은 것으로 보고되었다[14,28]. *Viola* 식물들은 한국의 전역에서 흔히 볼 수 있으며 한방과 민간에서 약재로 사용하며 항균[27] 및 소염 효과가 있는 것으로 보고되었다. 또한 민간에서는 불면증 치료에도 사용한다. 한약의 효능은 여러 성분의 복합적인 작용에 의한 것으로 이해되지만 제비꽃에 항균작용을 하는 cyclotide가 다량 존재한다는 사실[10]과 멜라토닌이 함유되어 있다는 사실[5]

*Corresponding author

Tel : +82-31-8005-3192, Fax : +82-31-8005-3191
E-mail : parkwj@dku.edu

은 제비꽃을 민간에서 약재로 활용하는 근거를 뒷받침한다.

본 연구에서는 이미 멜라토닌의 존재가 알려진 제비꽃 (*Viola mandshurica*) 외의 다른 *Viola* 식물들에 멜라토닌이 존재하는지 확인하고, 전구체인 Trp과 TAM을 공급하여 그 멜라토닌이 식물에서 작용할 것으로 제안된 tryptophan decarboxylase 경로를 통하여 생성되는지 시험하고자 하였다.

재료 및 방법

Viola 표준 추출물 시료의 분석

학명이 확인된 제비꽃 속 식물들의 표준 추출물은 한국식물추출물은행(<http://extract.pdrc.re.kr/extract/f.htm>)으로부터 구입하여 사용하였다(Table 1). 추출물을 1 ml의 100% 메탄올에 녹여 그 중 200 µl를 pH 10 이상에서 에틸 아세테이트로 분획한 후 감압 건조시키고 20 µl의 메탄올에 녹여 전량 HPLC로 분석하였다(Fig. 1A). Reverse-phase column (Apollo C18, 5 µm, Alltech, USA)을 HPLC system (600 E, Waters, USA)에 장착하여 0.8 ml/min의 flow rate으로 isocratic elution 하였다(solution A: 10% methanol, solution B: acetonitrile; A:B=6:4). 용출되는 멜라토닌은 형광분석기(470, Waters, USA)를 이용하여 360 nm emission을 측정하여 검출하였다(excitation: 275 nm).

Viola 식물재료의 준비 및 분석

경기도 용인 지역에 자생하는 제비꽃속(*Viola*) 식물들의 잎을 채취하여 증류수에 세척하고 띄워 30분간 전배양한 후

Table 1. Standard extracts from the Korea Plant Extract Bank which were used for melatonin detection by HPLC-FL

Extract Id from the Plant Extract Bank	Scientific name
A	003-029 <i>Viola dissecta</i> var. <i>chaerophylloides</i>
B	023-015 <i>Viola dissecta</i> var. <i>chaerophylloides</i>
C	004-087 <i>Viola albida</i>
D	005-077 <i>Viola keiskei</i>
E	028-077 <i>Viola mandshurica</i>
F	002-071 <i>Viola japonica</i>
G	005-068 <i>Viola japonica</i>
H	018-065 <i>Viola variegata</i>
I	025-097 <i>Viola woosanensis</i>
J	002-041 <i>Viola tokubuchiana</i> var. <i>takekana</i>
K	018-068 <i>Viola websteri</i>
L	004-067 <i>Viola acuminata</i>
M	027-081 <i>Viola acuminata</i>
N	015-053 <i>Viola takeshimana</i>
O	006-017 <i>Viola grypoceras</i>
P	014-013 <i>Viola grypoceras</i>
Q	020-017 <i>Viola grypoceras</i>
R	004-083 <i>Viola verecunda</i>

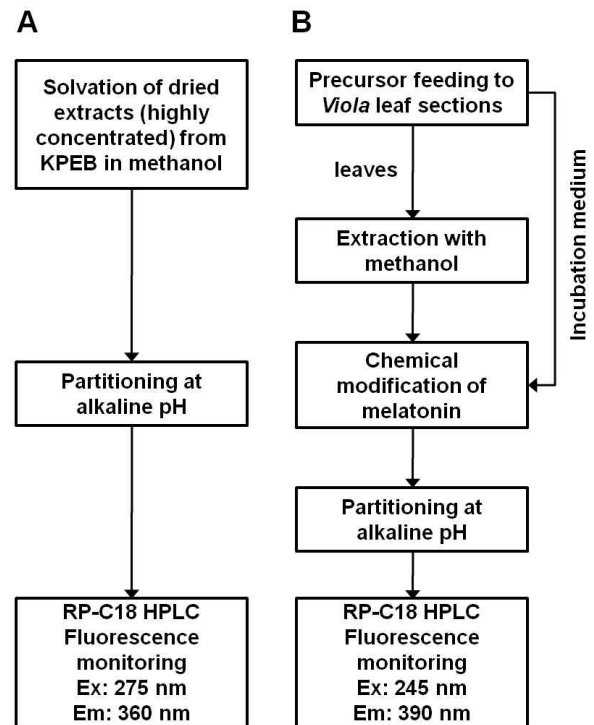


Fig. 1. Schematic illustrations of the analytical procedures of melatonin from *Viola* extracts obtained from Korea Plant Extract Bank (KPEB; A) and from the *Viola* leaf sections fed with a specified precursor of melatonin (B).

정방형(8 mm×8 mm) 절편을 만들어 약 0.25 g씩 5 ml의 배양용액(5 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8)에 띄웠다. 실험 목적에 따라 1 mM Trp 또는 1 mM TAM을 배양용액에 첨가한 후 완전한 암흑 속에서 15시간 배양하였다. 배양이 끝난 *Viola* 식물의 잎을 회수하여 1.2 ml의 100% 메탄올을 가하고 막자사발에서 곱게 간 후에 -20°C에서 최소 1시간 동안 추출하였다. 그 후 추출물을 원심분리(13,000 rpm×20 min, 4°C)하고 상등액을 취하여 100 µl 이하가 될 때까지 감압 건조하였다. 이 시료에 3차 증류수를 가하여 최종 부피를 500 µl로 맞춘 후 12.5 µl 250 mM H₂O₂와 62.5 µl 2 M CaCO₃를 가하고 30분간 100°C로 가열하여 멜라토닌을 N-[(6-methoxy-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-3-yl) methyl]acetamide (6-MOQMA)으로 산화시켰다[24]. 에틸 아세테이트로 3회 분획하여 감압 건조시킨 후 10% 아세토니트릴에 녹여 HPLC 주입용 시료로 사용하였다. 화학적으로 변형된 멜라토닌은 sterol C18 column을 이용하여 1 ml/min의 flow rate으로 isocratic elution 하였다(A: 0.3% acetic acid + 10% methanol, B: 100% acetonitrile; A:B=9:1). Elution은 fluorescence detector를 이용하여 검출하였다(emission: 390 nm; excitation: 245 nm). 멜라토닌 전구체를 공급한 배양액에서 조직으로부터 유출된 멜라토닌을 검출한 실험에서는

메탄을 추출을 실시하지 않고 곧바로 H₂O₂와 CaCO₃를 가하여 화학적 변형을 가하는 단계부터 시료분석 과정을 진행하였다(Fig. 1B).

결과 및 고찰

Viola 식물들에 존재하는 멜라토닌의 검출

한국추출물은행에서 획득한 13종 18개 시료를 HPLC로 분석한 결과 남산제비꽃(*Viola dissecta* var. *chaerophylloides*), 태백제비꽃(*V. albida*), 잔털제비꽃(*V. keiskei*), 제비꽃(*V. mandshurica*), 왜제비꽃(*V. japonica*), 알록제비꽃(*V. variegata*), 우산제비꽃(*V. woosanensis*), 민둥피제비꽃(*V. tokubuchiana* var. *takedana*), 왕제비꽃(*V. websteri*), 줄방제비꽃(*V. acuminata*), 섬제비꽃(*V. takeshimana*), 남시제비꽃(*V. grypoceras*), 콩제비꽃(*V. verecunda*)에서 멜라토닌이 검출되었다(Fig. 2). HPLC elution profile에서 태백제비꽃(*V. albida*, Fig. 2C)과 민둥피제비꽃(*V. tokubuchiana* var. *takedana*, Fig. 2J)에서 멜라토닌 신호가 다른 시료에서보다 크게 검출되었으나 정성적으로 이루어진 본 분석에서 신호의 크기가 반드시 식물체 내의 멜라토닌 함량을 반영한다는 것을 의미하지는 않을 것이다. 남시제비꽃(*V. grypoceras*)의 경우에는 같은 종에서도 추출물 시료에 따라서 peak의 크기가 다소 다르게 검출되었다(Fig. 2O-2Q). 그러므로 멜라토닌 peak의 크기보다는 분석에 사용된 모든 *Viola* 식물들의 추출물에서 멜라토닌 peak이 골고루 검출되었다는 사실이 더 중요한 것으로 사료된다. 이로부터 *Viola* 식물군에 따라서 함량의 차이는 있을 수 있지만 일반적으로 멜라토닌이 존재할 것이라는 추론이 가능하였다.

Trp, TAM 및 멜라토닌 표준시료의 분석

화학적 변형을 통하여 생성된 멜라토닌의 fluorescent 유도체를 검출하는 방법[24]의 유용성을 검증하기 위하여 20 nmoles의 Trp, TAM 그리고 멜라토닌 표준 시료를 각각 변형시킨 뒤 전구체를 가하고 식물 추출물 처리과정과 동일한 과정을 거친 후 HPLC-FL (emission 390 nm, excitation 245 nm)로 검출하였다(Fig. 3). 그 결과 전구체로 공급하는 Trp와 TAM은 elution profile에서 검출되지 않았으며 melatonin은 단일 peak으로 검출되었다. 이로부터 본 분석방법은 고농도의 전구체를 공급하여도 이에 방해 받지 않고 산물인 멜라토닌을 검출하는데 유용한 것을 확인하였다. 표준 시료의 peak 면적을 이용하면 생성되는 멜라토닌 양을 수치화 할 수는 있으나, internal standard가 아닌 external standard에 의한 수치에 의한 정량은 신뢰성이 떨어지므로 이후 과정에서는 멜라토닌의 검출 여부만을 주목하는 정성적인 논의로 제한하였다.

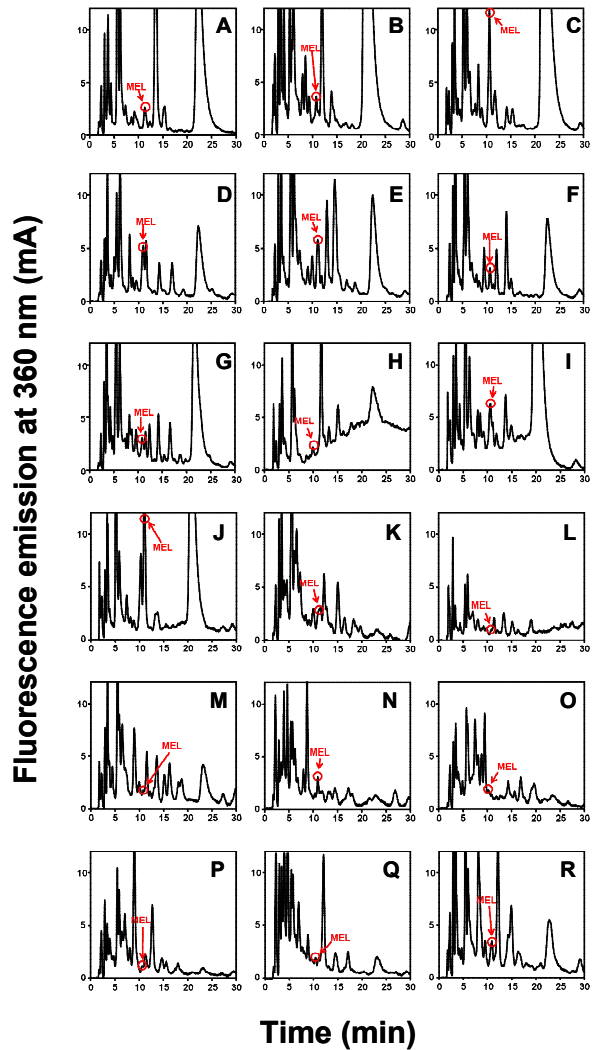


Fig. 2. Melatonin signals detected in the standard extracts from the Korea Plant Extract bank. A and B: *Viola dissecta* var. *chaerophylloides*, C: *Viola albida*, D: *Viola keiskei*, E: *Viola mandshurica*, F and G: *Viola japonica*, H: *Viola variegata*, I: *Viola woosanensis*, J: *Viola tokubuchiana* var. *takedana*, K: *Viola websteri*, L and M: *Viola acuminata*, N: *Viola takeshimana*, O-Q: *Viola grypoceras*, R: *Viola verecunda*. Fluorescence emission was monitored at 360 nm with the excitation at 275 nm. The sample Ids are indicated in Table 1.

전구체 공급시 생성되는 멜라토닌의 검출

멜라토닌 생합성의 최초 전구물질인 Trp과 tryptophan decarboxylase에 의하여 생성되는 바로 다음 단계의 중간대사 물질인 TAM [16]을 공급하고 이로부터 생성되는 멜라토닌을 HPLC-FL로 검출하였다(Fig. 4). 자생하는 *Viola* 식물의 잎을 완충용액에 띄우고 1 mM의 Trp 또는 TAM을 공급하고 멜라토닌이 생성될 것으로 예상되는 암조건에서 배양하였다. 시료로 사용한 식물은 잎의 형태 등을 근거로 제비꽃

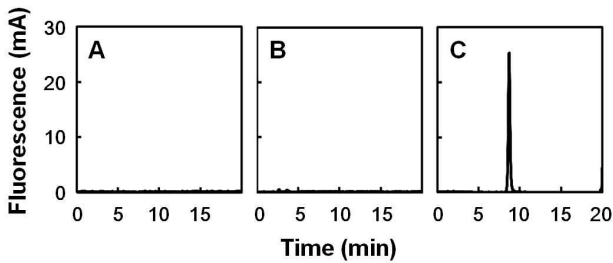


Fig. 3. Analysis of standard chemicals of tryptophan (Trp; A), tryptamine (TAM; B) and melatonin (MEL; C). For each analysis 0.2 nmoles of the chemicals were injected to HPLC. Fluorescence emission was monitored at 390 nm with the excitation at 245 nm.

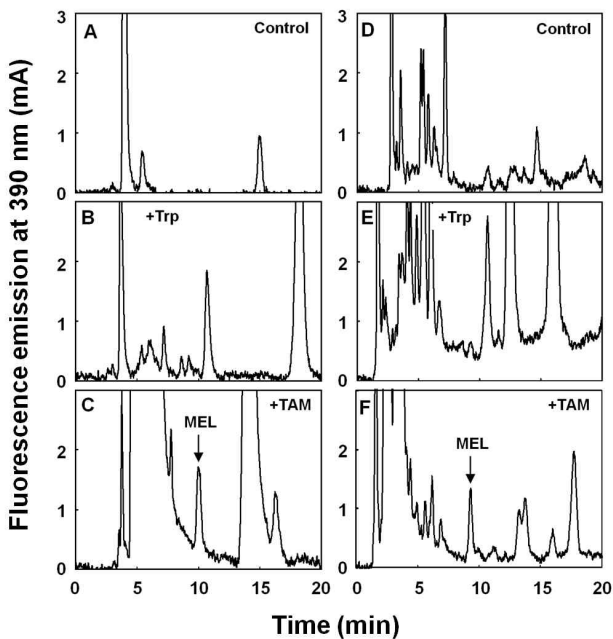


Fig. 4. Detection of melatonin after feeding of precursors to *Viola* leaf sections. The hypothesized starting material Trp (B and E) and the following intermediate TAM (C and F) were included in the incubation medium for 15 hr. MEL was analyzed both in the leaf extract (A, B, C) and in the used incubation medium (D, E, F). Fluorescence emission was monitored at 390 nm with the excitation at 245 nm. Endogenous melatonin appeared below the detection limit and was invisible in these preparations, which were not highly concentrated.

(*Viola mandshurica*)의 특징을 보이는 식물체를 채취하여 사용하였으나 근연종간의 자연적인 교배가 빈번하므로[14] 잡종일 가능성을 감안하여 *Viola* 식물로 통칭하였다. 비록 유전학적 배경은 사용된 시료간에 차이가 있을 수도 있지만 Fig. 2에서 확인한 바와 같이 *Viola*에서 멜라토닌은 광범위하게 존재하는 것으로 판단되므로 전구물질들을 공급하고

최종산물을 확인하고자 하는 본 실험의 목적에는 사용 가능한 것으로 판단하였다. 그에 따라 TAM을 공급하였을 때 *Viola* 식물의 잎에서 멜라토닌이 생성되는 것을 확인하였다 (Fig. 4C). 발견된 멜라토닌 신호는 동일한 화학적 변형을 가한 표준 멜라토닌 시료와 유사한 시간인 약 10분에 elution 되었으며, 표준 멜라토닌 시료를 식물체에서 분리한 시료에 첨가하여 HPLC로 분석하였을 때 해당되는 신호의 크기가 증가하는 것으로 멜라토닌이라는 것을 확인하였다(data not shown). 흥미롭게도 TAM을 공급한 *Viola* 식물의 추출물뿐 아니라 잎을 배양하였던 배양용액에서도 멜라토닌이 검출되었다(Fig. 4F). 이 결과는 *Viola* 잎에서 생성된 멜라토닌이 조직 밖으로 유출될 수 있다는 점을 보여준다. 신호의 elution time이 추출물의 경우와 약간 다르게 약 9분에 나타났으나 표준시료의 혼합 결과 멜라토닌 신호가 맞는 것으로 확인되었다(data not shown). 추출물과 배양용액 속에 포함된 서로 다른 물질들과의 상호작용 및 분석 시 전개용매의 증발 등이 elution time에 영향을 미칠 수 있지만 표준시료의 첨가로 신호의 정체성을 확인하였으므로 결과의 해석에는 이상이 없는 것으로 판단되었다.

멜라토닌 생합성이 시작되는 최초 전구물질인 Trp를 공급하였을 때에는 부레옥잠(*Eichhornia crassipes*)에서의 연구 결과[23]와는 달리 *Viola* 식물 추출물 및 배양용액 모두에서 멜라토닌의 증가가 확인되지 않았다(Fig. 4B and 4E). 그 이유는 외부에서 가해진 Trp가 단백질 합성에 사용되는 아미노산 pool로 유입되거나 중간 산물을 공유하는 다른 경로로 유입되어[3,5,16] 멜라토닌 합성 경로에서 사용되는 양이 적었을 가능성을 상정할 수 있을 것이다. 또한 조직 내로의 Trp 유입이 저조하여 효과가 없는 것으로 평가될 가능성도 있지만 외부에서 Trp를 공급하고 이루어진 다른 실험들에서 Trp 유입은 큰 문제가 없었으며[3,9,20], 본 실험에는 절단면을 지닌 잎의 절편을 사용하고 장시간 배양하였으므로 Trp 유입량이 저조한 것으로 모든 결과를 설명하기는 어려운 것으로 사료된다. 그 보다는 Trp 공급이 멜라토닌 함량에 직접적인 영향을 미치지 않는 것에 비추어 Trp 이후의 단계에서 멜라토닌 생합성의 조절이 이루어질 것이라는 점을 추론할 수 있다. 동물에서는 AANAT (Fig. 5)가 촉매하는 단계가 속도 결정단계인 것으로 알려져 있지만[2] 식물에서는 본 결과가 지지하는 바와 같이 Trp를 TAM으로 전환하는 과정이 속도 결정단계일 것이라는 점이 이미 제시되어 있는 상황이기도 하다[19]. 대조군 시료의 분석에서 내생 멜라토닌이 검출되지 않는(Fig. 4A) 이유는 외부에서 기질을 공급하고 실시하는 분석의 재료는 내생 멜라토닌이 검출될 수 있을 만큼 농축되지 않았기 때문에 내생 멜라토닌이 분석의 검출한계 이하로 존재하였기 때문이었다. 본 연구에서 TAM을 공급하였을 때 멜라토닌의 함량이 증가하는 결과는 tryptophan decarboxylase가 Trp를 TAM으로 전환하는 과

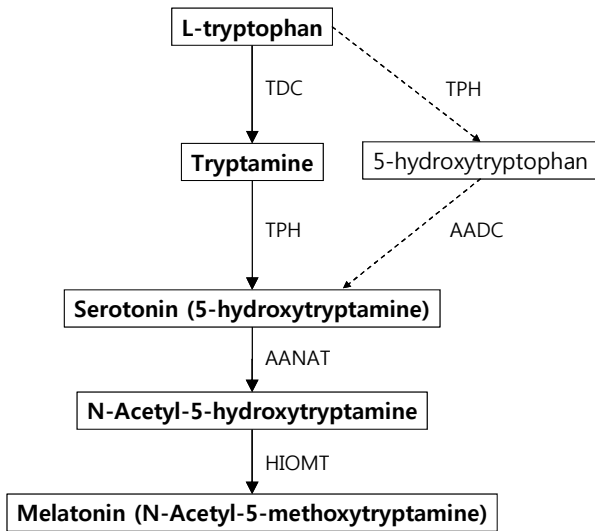


Fig. 5. Proposed biosynthetic pathways of melatonin in plants. TDC: tryptophan decarboxylase, TPH: tryptophan-5-hydroxylase, AADC: amino acid decarboxylase, AANAT: Serotonin N-acetyltransferase, HIOMT: Acetylserotonin N-methyltransferase. Pathways are re-constituted based on recent reviews [13]. Solid lines indicate the biosynthetic pathway supported by this work. Dotted lines show the pathway dominantly working in animal system.

정이 속도결정단계일 것이라는 가설을 지지하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단(현 한국연구재단)의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-003-C00258). 이 연구는 단국대학교 대학원 연구보조장학금의 지원으로 이루어진 것임.

References

1. Ambriz-Tututi, M., H. I. Rocha-Gonzalez, S. L. Cruz, and V. Granados-Soto. 2009. Melatonin: A hormone that modulates pain. *Life Sci.* **84**, 489-498.
2. Boutin, J. A., V. Audinot, G. Ferry, and P. Delagrang. 2005. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trend. Pharmacol. Sci.* **26**, 412-419.
3. Baldi, B. G., B. R. Maher, J. P. Slovin, and J. D. Cohen. 1991. Stable Isotope Labeling, in vivo, of D- and L-Tryptophan pools in *Lemma gibba* and the low incorporation of label into indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* **95**, 1203-1208.
4. Chatteraj, A., T. Liu, L. S. Zhang, Z. Huang, and J. Borjigin. 2009. Melatonin formation in mammals: *in vivo* perspectives.

- Rev. Endocr. Metab. Disord.* **10**, 237-243.
5. Chen, G., Y. Huo, D. X. Tan, Z. Liang, W. Zhang, and Y. Zhang. 2003. Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci.* **73**, 19-26.
6. Claustrat, B., J. Brun, and G. Chazot. 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* **9**, 11-24.
7. Ferguson, S. A., S. M. Rajaratnam, and D. Dawson. 2010. Melatonin agonists and insomnia. *Expert. Rev. Neurother.* **10**, 305-318.
8. Fuhrberg, B., I. Balzer, R. Hardeland, A. Werner, and K. Luning. 1996. The vertebrate pineal hormone melatonin is produced by the brown alga *Pterygophora californica* and mimics dark effects on growth rate in the light. *Planta* **200**, 125-131.
9. Glawischnig, E., A. Tomas, W. Eisenreich, P. Spitteller, A. Bacher, and A. Gierl. 2000. Auxin biosynthesis in maize kernels. *Plant Physiol.* **123**, 1109-1120.
10. Ireland, D. C., M. L. Colgrave, and D. J. Craik. 2006. A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability. *Biochem. J.* **400**, 1-12.
11. Kang, K., S. Kang, K. Lee, M. Park, and K. Back. 2008. Enzymatic features of serotonin biosynthetic enzymes and serotonin biosynthesis in plants. *Plant Signal. Behave.* **3**, 389-390.
12. Kolář, J. and I. Macháčková. 2005. Melatonin in higher plants. Occurrence and possible functions. *J. Pineal Res.* **39**, 333-341.
13. Korkmaz, A., T. Topal, D. X. Tan, and R. J. Reiter. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **10**, 261-270.
14. Lee, C. H. 1993. *Viola* native to Korea. *J. Korean Flower Res. Soc.* **2**, 13-22.
15. Malitsky, S., E. Blum, H. Less, I. Venger, M. Elbaz, S. Morin, Y. Eshed, and A. Aharoni. 2008. The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiol.* **148**, 2021-2049.
16. Murch, S. J. and P. K. Saxena. 2002. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development? *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **38**, 531-536.
17. Paredes, S. D., A. Korkmaz, L. C. Manchester, D. X. Tan, and R. J. Reiter. 2009. Phytomelatonin: a review. *J. Exp. Bot.* **60**, 57-69.
18. Poeggler, B., I. Balzer, R. Haderland, and A. Lerchl. 1991. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyactra*. *Naturwissenschaften* **78**, 268-269.
19. Posmyk, M. M. and K. M. Janas. 2009. Melatonin in plants. *Acta Physiol. Plant* **31**, 1-11.
20. Rodriguez, C., J. C. Mayo, R. M. Sainz, I. Antolin, F. Herrera, V. Martin, and R. J. Reiter. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* **36**, 1-9.
21. Schroeder, P., C. Abele, P. Gohr, U. Stuhlfauth-Roisch, and

- W. Gross. 1999. Latest on enzymology of serotonin biosynthesis in walnut seeds. *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**, 637-644.
22. Srinivasan V, D. W. Spence, S. R. Pandi-Perumal, I. Trakht, and D. P. Cardinali. 2008. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr. Cancer Ther.* **7**, 189-203.
23. Tan, D. X., L. C. Manchester, P. Di Mascio, G. R. Martinez, F. M. Prado, and R. J. Reiter. 2007. Novel rhythms of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. *FASEB J.* **21**, 1724-1729.
24. Tomita, T., K. Hamase, H. Hayashi, H. Fukuda, J. Hirano, and K. Zaitzu. 2003. Determination of endogenous melatonin in the individual pineal glands of inbred mice using precolumn oxidation reversed-phase micro-high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **316**, 154-161.
25. van Tassel, D. L., N. Roberts, A. Lewy, and S. D. O'Neill. 2001. Melatonin in plant organs. *J. Pineal Res.* **31**, 8-15.
26. Vivien-Roles, B. and P. Pevet. 1993. Melatonin: presence and formation in invertebrates. *Experientia* **49**, 642-647.
27. Witkowska-Banaszczak, E, W. Bylka, I. Matławska, O. Goślińska, and Z. Muszyński. 2005. Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb. *Fitoterapia* **76**, 458-461.
28. Yoo, K. O. and J. H. Kim. 2006. Analysis of taxonomic relationships of Korean *Viola* based on *trnL-trnF* region sequences of chloroplast DNA. *Flower Res. J.* **14**, 232-240.

초록 : 제비꽃속(*Viola*) 식물에서 tryptophan과 tryptamine 공급이 멜라토닌 생성에 미치는 영향

김여재 · 윤영하 · 박웅준*

(단국대학교 분자생물학과 & 단국대학교 나노센서바이오텍연구소)

동물호르몬으로 알려진 멜라토닌(melatonin)은 동물뿐 아니라 고등 식물을 포함한 다양한 생명체에 존재한다. 식물에서는 쌍떡잎 식물과 외떡잎 식물에 멜라토닌이 널리 존재하며 일부 약용 식물에는 다량으로 함유되어 있지만 아직 그 생합성 과정과 생리학적 기능은 확립되지 않았다. 본 연구에서는 reverse phase HPLC 분석을 통하여 이제까지 분석이 이루어지지 않았던 여러 제비꽃속(*Viola*) 식물들에 멜라토닌이 고르게 분포한다는 사실을 확인하였다. 그 다음 제비꽃속 식물들의 잎 절편을 배양하며 멜라토닌의 최초 전구체로 제안된 tryptophan (Trp)과 이의 탈카르복시화(decarboxylation) 중간산물인 tryptamine (TAM)을 공급하였다. 그 결과 Trp를 공급하면 멜라토닌 생성에 영향을 미치지 않았지만 TAM을 공급한 경우에는 멜라토닌의 함량이 증가하였다. TAM은 Trp에서 유래하므로 Trp - TAM 경로가 제비꽃속 식물에도 존재하는 것으로 판단되며, Trp 공급이 멜라토닌 함량에 영향을 미치지 않는 결과는 Trp를 TAM으로 전환하는 탈카르복시화 과정이 식물 멜라토닌 생합성 과정의 속도결정 단계일 것이라는 가설을 지지하는 것으로 사료된다.