

대두 이소플라본 당전이 반응 산물의 콜레스테롤 생합성 저해 효과

- 연구노트 -

유랑국^{1*} · 최승준^{2*} · 문태화^{1,3} · 심재훈⁴

¹서울대학교 농생명공학부, ²서울과학기술대학교 식품공학과
³서울대학교 식품바이오통합연구소, ⁴한림대학교 식품영양학과

Inhibitory Effects of Transglycosylation Products of Soy Isoflavones on Cholesterol Biosynthesis

Lang Kuk Yoo^{1*}, Seung Jun Choi^{2*}, Tae Wha Moon^{1,3}, and Jae-Hoon Shim⁴

¹Department of Agricultural Biotechnology and ³Center for Food Bioconvergence, Seoul National University

²Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology

⁴Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

ABSTRACT Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) is the rate-limiting enzyme in biosynthesis of cholesterol in animals. In this study, inhibitory effects of isoflavone glycosides on HMG-CoA reductase were investigated. At sample concentration of 100 μ M, genistein-7-O-triglucoside (G2-genistin) inhibited HMG-CoA reductase activity by approximately 18%, whereas daidzein-7-O-triglucoside had no inhibitory effect. In the kinetic experiments with Syrian hamster HMG-CoA reductase, G2-genistin showed inhibitory efficacy with an invariable V_{max} value, suggesting that G2-genistin works as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase and has potential for hypocholesterolemic action through direct regulation of HMG-CoA reductase.

Key words: soybean, isoflavone, isoflavone glycoside, HMG-CoA reductase, cholesterol biosynthesis

서 론

콩은 아시아에서 1000년 이상 폭넓게 소비되었으며, 인간의 건강과 질병에 대한 콩의 효능은 오랜 기간 연구되었다. Anthony(1)의 연구에 의하면 콩 음식을 소비하는 것은 심혈관 축소 질환(1-5) 및 골다공증의 예방에 좋은 영향을 미칠 수 있으며(6), 폐경기 증상 완화에도 긍정적인 영향을 준다는 보고가 있다(7). 특히 대두의 구성 요소 중 대두 이소플라본은 에스트로겐 활성(8), 항산화 작용(9), 항골다공증(10), 항암 작용(11)이 있다고 보고되었다. 또한 Wagen 등(12)의 연구에 따르면 일반적인 콜레스테롤과 가벼운 고콜레스테롤의 폐경기 여성의 혈장지질을 개선한다고 발표하였다. Sung 등(13,14)은 생체 외 실험을 통해 한국의 된장에 함유된 이소플라본이 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A(HMG-CoA) reductase를 저해한다는 것을 보여주었다. 특히 HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성의 초기 단계에서 HMG-CoA를 mevalonic acid로 전환함으로써 콜

레스테롤을 생합성 한다고 알려져 있어, 이소플라본이 콜레스테롤 생합성 저해에 효과가 있음을 알 수 있다.

이러한 이소플라본의 흥미로운 생물학적 활성에도 불구하고 이소플라본의 낮은 수용성으로 인하여 식품에 적용하는 것은 쉽지 않으며, 또한 glycone과 aglycone 형태의 이소플라본 모두의 낮은 수용성은 신체 내에서 그것들의 낮은 생체이용률의 이유가 되기도 한다(15-17). 그런 이유로 이소플라본의 식품에 적용성을 높이기 위하여 이소플라본의 수용성을 높이는 다양한 연구가 진행되었다. 이 중 생물학적 방법으로 *Thermotoga maritima* maltosyltransferase의 당전이 반응을 이용하여 genistin 당전이 반응 산물들의 용해도를 1,000~10,000배 증가시켰고, genistin 당전이 산물들은 여전히 그것의 생물학적 활성을 유지하고 있다는 결과가 보고된 바 있다(15,18).

그러나 이소플라본의 생물학적 활성들이 잘 알려진 것에 비하여 이소플라본의 당전이 반응 산물들의 콜레스테롤 저하 효과에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 대두 이소플라본 당전이 반응 산물들의 콜레스테롤 저하 효과를 시험하고 HMG-CoA와 NADPH를 사용하여 HMG-CoA reductase에 대한 genistin과 daidzin 당전이 반응 산물들의 저해 효과를 확인하였다.

Received 13 August 2015; Accepted 25 September 2015

Corresponding author: Jae-Hoon Shim, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, Gwangwon-do 24252, Korea

E-mail: jhshim@hallym.ac.kr, Phone: +82-33-248-2137

*These authors contributed equally to this work.

재료 및 방법

재료

대두 이소플라본 혼합물(35% 이소플라본 배당체)은 폴무원(Seoul, Korea)에서 제공받았으며, maltotriose 및 그 밖의 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

당전이 반응 산물의 생산

Daidzin과 genistin의 당전이 반응은 Li 등(15)이 확립한 최적 조건에서 수행하였다. 대두 이소플라본 혼합물을 물에 용해시킨 후, 혼합물 속에 함유된 탄수화물과 친수성 이물질들은 C18 칼럼을 사용하여 제거하였다. 메탄올에 용해된 대두 이소플라본은 0.45 μm 멤브레인(GyroDisc Syr. CA-PC 30 mm, Orange Scientific, Gaignette, Belgium)으로 여과 후 당전이 반응의 기질로써 사용하였다.

당전이 반응 산물의 정제 및 분석

이소플라본 당전이 반응 산물은 TLC와 LC-MS를 통해 확인하였다. Daidzin과 genistin 당전이 반응의 주된 산물은 recycling preparative HPLC를 이용하여 정제하였으며, 반응 산물의 분석을 위하여 RI detector(JAI, Tokyo, Japan)와 고분자 겔 여과 칼럼(W-251, JAI)을 장착한 HPLC(LC-918, JAI)의 재순환을 통해 보다 더 정제하였다. HPLC 이동상으로는 메탄올을 사용하였으며 이동상의 속도는 3 mL/min으로 조절하였고 시료주입량은 3 mL였다. 회수한 daidzin과 genistin은 rotary vacuum evaporator(Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 저장하였다.

시리아 햄스터 HMG-CoA reductase(R_{cat} EEF)를 이용한 흡광도 분석법

시리아 햄스터 HMG-CoA reductase 플라스미드, pKFT7-21은 Purdue University의 Victor W. Rodwell 교수로부터 제공받았고, HMG-CoA reductase는 *Escherichia coli*(*E. coli*)에서 과발현 되었으며 Frimpong 등(19)의 방법에 따라 정제하였다. HMG-CoA에 의존적인 NADPH 산화는 37°C에서 diode array spectrophotometer(Ultrospec 4000, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Sweden)를 이용하여 340 nm에서 관찰하였다. 표준 혼합물은 최종 150 μL 에 200 μM D,L-HMG-CoA , 200 μM NADPH, 100 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)가 포함하도록 하였다. 정제된 효소와 HMG-CoA를 제외한 다른 구성요소를 포함하는 반응 혼합물에서 HMG-CoA 비의존적인 NADPH의 산화를 먼저 관찰한 후, HMG-CoA를 첨가하여 반응을 시작하였다. HMG-CoA reductase의 1 unit은 1분 동안 1 μmol 의 NADPH가 산화하는 것을 촉진하는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질의 농도는 bovine serum albumin(BSA)

을 표준물질로 사용하는 Bradford(20)의 방법으로 측정하였다.

R_{cat} EEF의 발현

R_{cat} EEF의 발현을 위하여 pKFT7-21 유전자가 함유된 *E. coli* BL21(DE3)을 5 mg의 ampicillin이 포함된 Luria-Bertani 배지(LB_{amp} 배지)에 접종하였다. 세포는 37°C로 교반되며 12시간 배양된 후 1 L의 새로운 LB_{amp} 배지로 옮겨 같은 조건 하에서 배양하였다. 세포의 밀도(A_{600})가 0.8~1.0에 도달했을 때 isopropyl β -D-thiogalactoside(IPTG)의 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가해주며, 5시간 더 배양을 계속하였다. 건조 세포 1 g당 buffer A[20 mM sodium phosphate buffer pH 7.3, 50 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol, 100 mM sucrose, 10 mM dithiothreitol] 15 mL가 되도록 희석한 후, 원심분리(10,000 $\times g$, 15 min, 4°C)를 통해 세포를 회수하였다.

R_{cat} EEF의 정제

분리된 세포는 ice bath에서 초음파 분쇄기(VC-600, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA)를 이용하여 분쇄하였다. 세포 분쇄물은 원심분리(10,000 $\times g$, 60 min, 4°C) 하여 침전된 세포 잔해를 폐기하고 상층액의 부피를 측정하였다. 100 g의 35%로 포화된 상층액을 얻기 위해 농축된 NH_4OH 로 실온에서 pH 7.4로 조절하여 포화된 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 상층액 1 mL당 0.54 mL 첨가하였다. 혼합물은 15분 동안 실온에서 조심스럽게 교반하고 원심분리(10,000 $\times g$, 20 min, 4°C) 하였다. 상층액(35% sup)을 분주하여 부피를 측정하였다. 0~35% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전물은 폐기하였다. 55% 포화 용액을 만들기 위해 각각의 35% sup 1 mL당 0.44 mL의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액을 첨가하였다. 혼합물은 조심스럽게 교반하고 앞서 설명한 방법으로 원심분리 한 후 상층액은 제거하였다. 35~55%의 침전물은 35~55% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 추출물을 만들기 위해 5~10 mL의 buffer A에 녹였다. 이 수용액을 액체질소를 이용하여 동결하여 보관하고, 이것을 HMG-CoA reductase 측정법에 이용하였다.

저해제의 정제를 위하여 35~55% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 추출물에 Blue Sepharose CL-6B 칼럼(16 \times 140 mm, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 정제하였다. 1 mL의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 추출물은 10 mL의 buffer A로 희석하였고 이를 buffer A로 평형을 유지한 Blue Sepharose CL-6B 칼럼에 투입 후 0 M에서 1.2 M의 NaCl 농도구배를 수행하여 정제하였다. 각 분획별로 역가를 측정하여 reductase 역가를 보이는 분획을 모은 후 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 효소 단백질을 침전시키고 원심분리(10,000 $\times g$, 30 min, 4°C)를 실시하여 분리하였다. 침전된 단백질은 buffer A에 용해시킨 후 액체질소에 보관하였다. 이 추출물은 저해 반응 속도 실험을 위해 사용하였다.

저해 반응 kinetic study

효소 반응은 다양한 농도의 저해제를 사용하여 수행하였다. 저해제의 저해 유형은 Lineweaver-Burk 식으로 확인하였으며, V_{max} , k_{cat} , K_m 와 같은 반응속도론의 매개변수는 선형회귀 분석법을 사용하여 계산하였다. NADPH는 200 μ M로 유지하였고 HMG-CoA는 6.25~100 μ M 범위에서 사용하였다. 저해제의 K_i (저해상수)은 위에서 얻은 결과를 기초로 하여 계산하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.2(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였으며, 유의성 차이를 검증하기 위해 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

Daidzin과 genistin 당전이 반응 산물의 존재는 LC-MS 분석을 통해 확인하였다(Fig. 1). LC-MS를 사용하여 분석한 daidzin과 genistin 당전이 반응 혼합물에서 다양한 피크

를 관찰하였다. 그 피크들은 이소플라본을 포함한 daidzin과 genistin이 당전이 반응된 부산물의 계산된 분자 질량과 일치하였다. 4개의 피크는 각각 m/z 271($[M-3\text{glucoside}+H]^+$), m/z 433($[M-2\text{glucoside}+H]^+$), m/z 595($[M-\text{glucoside}+H]^+$), m/z 757($[M+H]^+$)로 genistin 당전이 반응 산물 양성자 이온의 계산된 분자 질량과 일치하였다. 그리고 5개의 피크는 각각 m/z 255($[M-3\text{glucoside}+H]^+$), m/z 269($[M-\text{glucoside}+Na]^+$), m/z 417($[M-2\text{glucoside}+H]^+$), m/z 579($[M-\text{glucoside}+H]^+$), m/z 741($[M+H]^+$)로 소듐이 첨가된 daidzin 당전이 반응 산물과 양성자 이온의 계산된 분자 질량과 일치하였다.

HMG-CoA reductase에 대한 저해 효과는 이소플라본 배당체를 사용하여 측정하였다(Fig. 2). Genistein-7-O-monoglucoside(genistin)와 genistein-7-O-triglucoside(G2-genistin) 각각 9%와 5% 정도의 저해 효과를 보여주었다. 그러나 이들 사이에서 저해 효과에 대한 유의적 차이를 나타내지는 않았다. Daidzein-7-O-monoglucoside(daidzin)와 daidzein-7-O-triglucoside(G2-daidzin)는 HMG-CoA reductase에 대한 저해 효과를 갖고 있지 않았다. Daidzin과 G2-daidzin이 HMG-CoA reductase에 대한 저

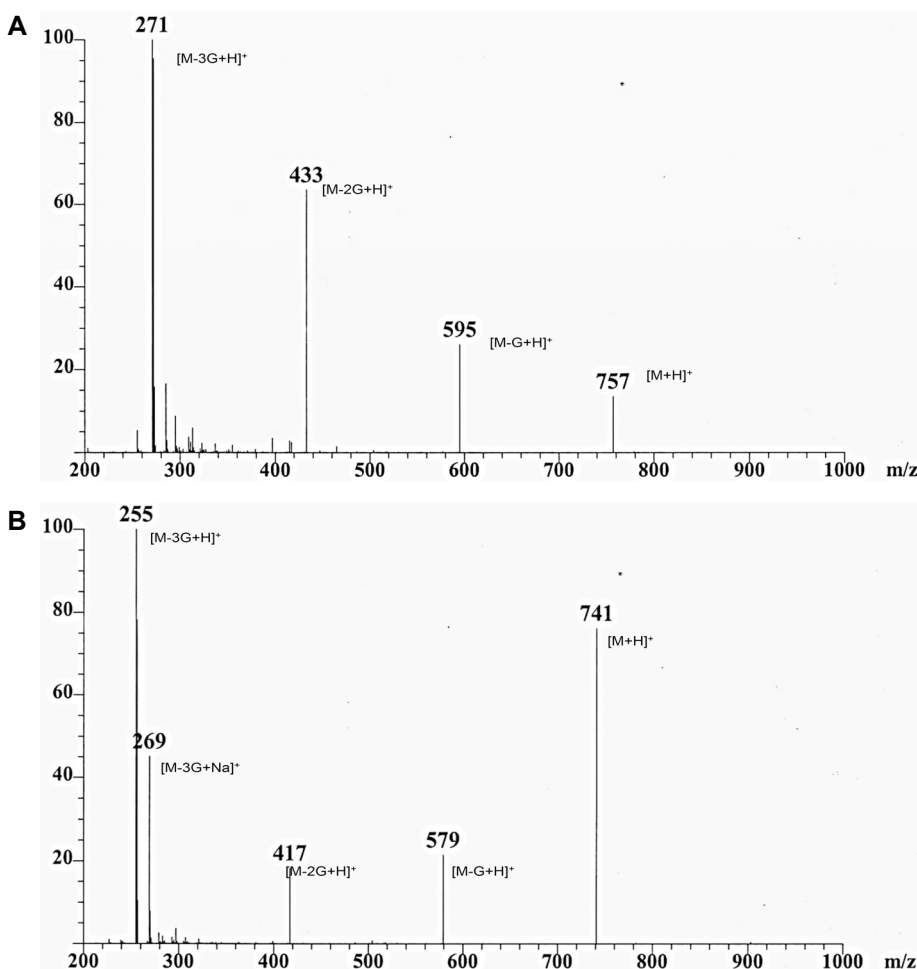


Fig. 1. LC-MS chromatograms of genistein (A) and daidzein-7-O-triglucosides (B).

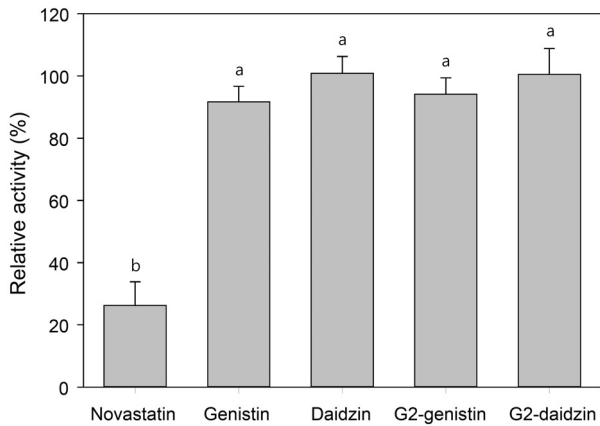


Fig. 2. HMG-CoA reductase inhibition of genistin, daidzin, genistein-7-*O*-triglucoside (G2-genistin), and daidzein-7-*O*-triglucoside (G2-daidzin) at various concentrations. Values with different letters (a, b) on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

해 효과를 나타내지 않았기 때문에 HMG-CoA reductase 저해 효과에 대한 연구는 genistin과 G2-genistin으로 수행하였다. Lineweaver-Burk(LB) plot으로 저해 유형을 예측할 수 있기 때문에 각각의 저해제에 대한 도면을 조사하였다. 농도에 따라 저해 정도는 다르나 V_{max} 에서 동일한 값으로 수렴하는 것으로 보아 G2-genistin은 HMG-CoA에 대한 경쟁적 저해제로 작용함을 확인하였다(Fig. 3). HMG-CoA에 대한 K_i (저해상수)는 G2-genistin에 대해 128.0 μM 이었다. Sung 등(14)은 이소플라본의 HMG-CoA reductase 저해에 대한 선행 연구에서 genistin의 aglycone 유형인 genistein은 27.7 μM 의 저해상수(K_i)로 HMG-CoA와 경쟁적 저해를 하는 것으로 보고하였다. 이 결과는 이소플라본이 HMG-CoA reductase의 HMG-CoA 결합 부위인 소수성 부분에 결합함으로써 HMG-CoA와 HMG-CoA reductase 간의 steric hindrance를 일으켜 HMG-CoA reductase를 저해한다는 것을 시사한다(14). 따라서 aglycone 유형(genistein)의 HMG-CoA reductase 저해 효과와 비교하

여 genistin 당전이 반응 산물의 HMG-CoA reductase에 대한 낮은 저해 효과는 그것의 낮은 소수성에 기인한다고 할 수 있다. Genistin에 새로 도입된 배당체는 HMG-CoA reductase의 소수성 부분과 이소플라본의 소수성 부분 간의 상호작용을 통해 저해 활성화에 영향을 줄 수 있다. Daidzin 당전이 반응 산물은 HMG-CoA reductase에 대한 저해 효과를 보여주지 못했다. 만약 이소플라본이 소수성 상호작용을 통해 HMG-CoA reductase의 활성 부분과 결합함으로써 HMG-CoA reductase를 저해한다는 가설이 정확하다면, daidzein(daidzin의 aglycone 유형)의 더 적은 소수성 특징 때문에 genistein보다 낮은 저해 효과를 입증할 수 있다(21). Daidzein은 genistein보다 낮은 HMG-CoA reductase 저해 효과를 보여준다고 보고하였다(14). 따라서 당전이 반응은 daidzin의 소수성을 감소시켰으며, 이러한 용해도의 변화는 genistin 당전이 반응 산물의 더 적은 저해 효과와 daidzin 당전이 반응 산물의 저해 효과가 없음에 대한 주된 이유라고 할 수 있다. Glycoside의 당전이 반응은 aglycone의 수용성 증대에 큰 영향을 미친다(15-17). 비록 G2-genistin의 저해상수가 기존에 보고된 aglycone 형태인 genistein에 비하여 상대적으로 높으나 G2-genistin은 당전이 반응을 통하여 높은 수용성을 지니게 되므로 G2-genistin의 고형분말뿐 아니라 액상의 형태로도 식품에 사용이 가능하여 그 활용도가 확장될 것으로 사료된다.

본 연구는 이소플라본 당전이 반응의 산물이 HMG-CoA reductase의 새로운 저해제로서의 가능성을 보여주었다. 또한 이소플라본이 HMG-CoA reductase의 일반적인 기질인 HMG-CoA와 구조적 유사성을 갖고 있지 않기 때문에 이소플라본의 HMG-CoA reductase와의 당전이 산물 간의 저해 매커니즘은 명확하지 않지만, inhibition kinetic study를 통하여 당전이 산물들이 경쟁적 저해제로 작용함을 확인하였다.

요 약

HMG-CoA reductase는 체내 콜레스테롤 생합성에 있어서 속도제한단계(율속) 효소이다. 본 연구는 HMG-CoA reductase에 대한 이소플라본 배당체의 저해 효과를 연구하였다. 100 μM 의 농도에서 genistein-7-*O*-triglucoside(G2-genistin)는 HMG-CoA reductase 활성을 약 18% 정도 저해하였으나, daidzein-7-*O*-triglucoside는 저해 효과를 갖지 않았다. 시리아햄스터 HMG-CoA reductase의 반응속도 실험에서 G2-genistin은 농도에 관계없이 V_{max} 의 저해 정도가 일정하였으며, 이것은 G2-genistin이 HMG-CoA reductase의 경쟁적 저해제로 작용함을 시사하고 HMG-CoA reductase의 활성을 직접적으로 저해함으로써 혈중 콜레스테롤 함량을 감소시킬 수 있음을 예상할 수 있다.

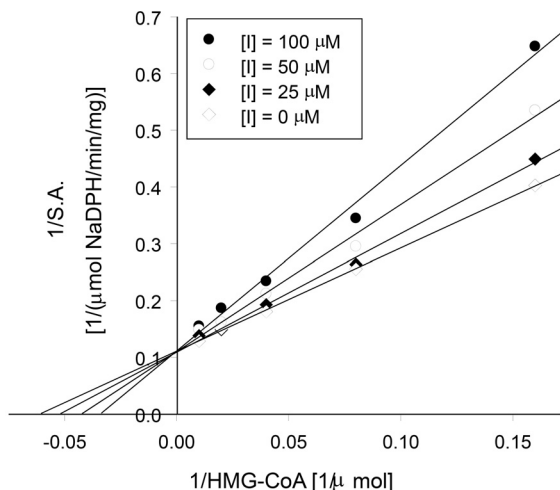


Fig. 3. Inhibition kinetics of genistein-7-*O*-triglucoside.

REFERENCES

1. Anthony MS. 2000. Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. *J Nutr* 130: 662S-663S.
2. Choi YS, Kim JH, Yoon DH. 2002. Effects of soy extract and sex on serum and liver lipid levels of the rat. *Food Sci Biotechnol* 11: 10-13.
3. Lichtenstein AH. 2001. Potential benefits of soy protein in managing patients with hypercholesterolemia. *Nutr Clin Care* 3: 139-144.
4. Nagata C. 2000. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. *Int J Epidemiol* 29: 832-836.
5. Wong WW, Smith EO, Stuff JE, Hachey DL, Heird WC, Pownell HJ. 1998. Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 68: 1385S-1389S.
6. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. 2000. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72: 844-852.
7. Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T. 2001. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol* 97: 109-115.
8. Boué SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE. 2003. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem* 51: 2193-2199.
9. Kapiotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H, Gmeiner BM. 1997. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2868-2874.
10. Anderson JJB, Garner SC. 1997. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr Rev* 17: 1617-1632.
11. Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, Höckerstedt KA, Watanabe S, Hämäläinen EK, Markkanen MH, Mäkelä TH, Wähälä KT, Adlercreutz T. 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr* 125: 757S-770S.
12. Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS. 2001. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 73: 225-231.
13. Sung JH, Choi SJ, Lee SW, Park KH, Moon TW. 2004. Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1051-1058.
14. Sung JH, Lee SJ, Park KH, Moon TW. 2004. Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase *in vitro*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 428-432.
15. Li D, Park JH, Park JT, Park CS, Park KH. 2004. Biotechnological production of highly soluble daidzein glycosides using *Thermotoga maritima* maltosyltransferase. *J Agric Food Chem* 52: 2561-2567.
16. Li D, Park SH, Shim JH, Lee HS, Tang SY, Park CS, Park KH. 2004. In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase. *Carbohydr Res* 339: 2789-2797.
17. Li D, Roh SA, Shim JH, Mikami B, Baik MY, Park CS, Park KH. 2005. Glycosylation of genistin into soluble inclusion complex form of cyclic glucans by enzymatic modification. *J Agric Food Chem* 53: 6516-6524.
18. Chung MJ, Kang AY, Lee KM, Oh E, Jun HJ, Kim SY, Auh JH, Moon TW, Lee SJ, Park KH. 2006. Water-soluble genistin glycoside isoflavones up-regulate antioxidant metallothionein expression and scavenge free radicals. *J Agric Food Chem* 54: 3819-3826.
19. Frimpong K, Darnay BG, Rodwell VW. 1993. Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase expressed in *Escherichia coli*: production of homogeneous protein. *Protein Expr Purif* 4: 337-344.
20. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
21. Breton M, Precigoux G, Courseille C, Hospital M. 1975. Génisteine. *Acta Crystallogr Sect B* 31: 921-923.