

인삼 사포닌 생합성의 기능 유전체 연구
최 동 욱 박사 / 유진텍(주) 대표이사

인삼 사포닌(Ginsenoside) 생합성의 기능유전체 연구

유진택(주) 최 동 욱

1. 서론

Genomics와 bioinformatics 발달과 함께 현재 생명과학은 앞으로 다가올 산업기술에 있어서 가장 영향력 있는 분야의 하나로 대두되고 있다. 분자 유전학 수준에서 생명현상의 이해는 이제 한 두개의 유전자보다는 전체 생물 genome에 존재하는 모든 관련 유전자들을 대상으로하여 진행되고 있으며 이러한 연구 결과들은 생명현상의 이해뿐만 아니라 미래 생물 산업의 기반을 이루게 될 것이다. 따라서 아직 유전자 수준에서 규명되지 않는 산업적으로 가치가 있는 대사 과정을 functional genomics 시스템을 이용하여 관련 유전자들을 선점하는 일은 매우 중요하고 시급한 일 중의 하나이다.

인삼은 오가피과 (Araliaceae) Panax속에 속하는 식물로 북미에서 생산되는 미국삼 (*Panax quinquesfolium*), 중국에서 생산되는 삼칠삼 (*Panax notoginseng*)등 6종류가 있으며, 그중 한국에서 생성되는 인삼 (*Panax ginseng*)은 약리효과가 가장 뛰어나 그 우수성이 인정되고 있다. 특히 한국 인삼은 면역력 증가, 암 예방, 노화 억제, 피로회복, 뇌 기능 강화 등에 다양한 약리 효과를 보이는 많은 유용 이차대사물질들을 생산하는 중요한 유전자원이다. 인삼에 포함되어 있는 많은 약리성분 중 특히 인삼 사포닌 (Ginsenoside)는 인삼의 가장 중요한 약리 성분으로 알려지고 있으며 현재 약 30종류 이상이 분리 보고 되어 있다. 인삼 사포닌은 기본 형태인 triterpene 어글리콘 (aglycone)에 하나 또는 여러 개의 당이 결합함으로써 다양한 종류의 사포닌이 만들어지며, 사포닌의 종류에 따라 다양한 약리 작용을 나타낸다 (표 1).

약리 효과	인삼 사포닌
항염증 작용, 혈소판 응집억제	Ro, Rg1, Rg2
항산화 작용	Rg1, Rb1
항암작용	Rg3, Rh2
통증억제 작용	Rc, Rf
중추억제 및 정신 안정	Rb1
면역 기능 강화	Rg1
항 당뇨 작용	Rb2

표1. 주요 인삼사포닌 (Ginsenoside)의 약리 작용

그러나 이러한 사포닌은 인삼 생체량에 매우 소량으로 존재한다. 따라서 약리 활성이 확인된

인삼 사포닌을 대량 생산 할 수 있다면 이는 단일 사포닌 또는 몇 가지의 사포닌 혼합체를 이용하여 건강 보조 식품은 물론 의약품 그리고 다양한 인삼 가공제품의 개발이 가능하게 될 것이다. 그러나 사포닌의 이러한 상업적 중요성에도 불구하고 아직 정확한 사포닌 생합성 경로 및 관련 유전자 그리고 조절 기작에 대해서는 알려지지 않았다. 인삼 사포닌의 생합성 경로 및 관련 유전자들이 밝혀지면 사포닌 대량 생산은 물론 특정 인삼 사포닌의 선별적 생산을 가능하게 함으로써 관련 산업의 발달에 크게 기여할 것으로 기대된다.

2. 인삼 사포닌 (Ginsenoside)의 생합성

사포닌은 인삼뿐만 아니라 많은 식물체에 존재하는 중요한 이차대사물 중 하나로 구조적으로 보면 스테로이드 (steroid), 알칼로이드 (alkaloid) 또는 트리테펜 (triterpene) 에 당이 결합해있는 배당체로 인삼 사포닌은 triterpene에 당이 결합되어 있는 triterpene 사포닌이다.

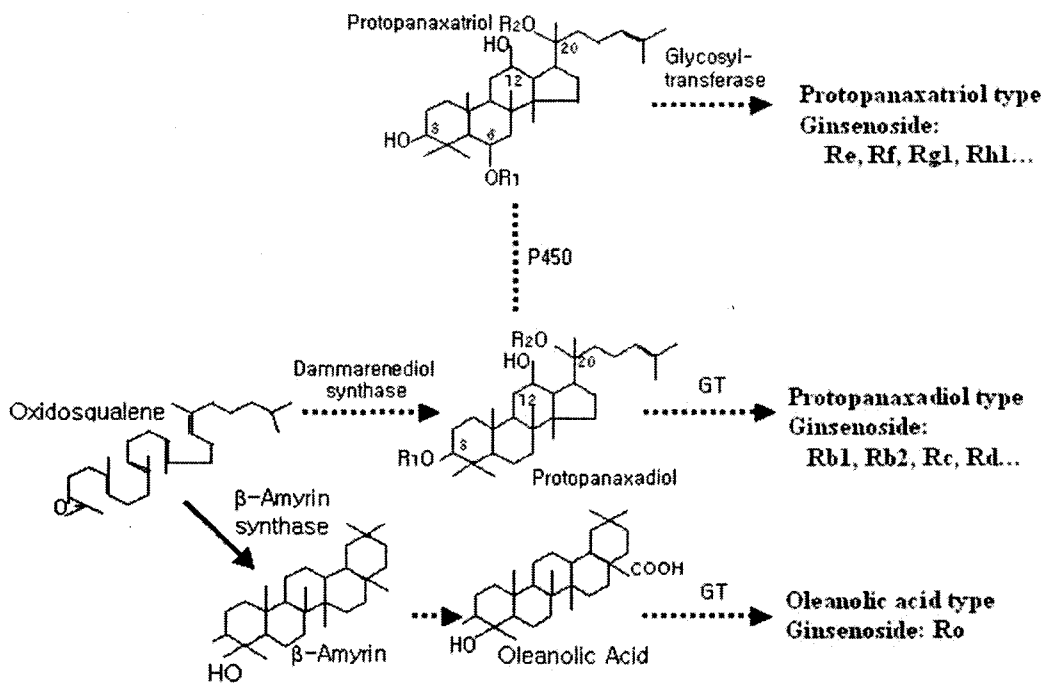


그림 1. 인삼 사포닌 (Ginsenoside) 생합성 경로

점선은 아직 밝혀지지 않는 생합성 경로를 표시함

GT, glycosyltransferase; P450, cytochrome P450

따라서 인삼 사포닌은 세포질 내에서 triterpene 생합성 경로를 통해 합성된다 (그림 1). 인삼 사포닌은 aglycone 에 따라 크게 세 가지 즉 Oleanane 형과 두 종류의 Damarane 형 (protopanaxadiol 및 protopanaxatriol)으로 나눌 수 있다. 지금까지 알려진 대부분의 ginsenoside는 Damarane형에 속하며 Oleanane 형으로는 ginsenoside-Ro 가 알려져 있다. Oleanane 및 Damarane triterpene은 2,3-oxidosqualene으로부터 만들어 진다. 2,3-oxidosqualene은 생체내 중요 물질인 스테롤의 기질이 되는 cycloartenol 및 기타 다양한 triterpene 합성의 기질로도 사용되기 때문에 2,3-oxidosqualene로부터 ginsenoside aglycon의 합성은 매우 중요한 branchingpoint 이다. 이 단계에 관계되는 효소는 2,3-oxidosqualene cyclase (OSC)로 효소의 종류에 따라 공통 기질인 2,3-oxidosqualene로부터 각각 다른 triterpene을 만든다 (표 2).

효소 이름	약어	EC number	생물체
Lanosterol synthase	LS	EC 5.4.99.7	Fungi, animals
Cycloartenol synthase	CS	EC 5.4.99.8	Plants
β -Amyrin synthase	AS	EC 5.4.99	Plants
Lupeol synthase	LS	EC 5.4.99	Plants
Dammarenediol synthase	DS		

표 2. 2,3-oxidosqualene cyclase의 종류

인삼 사포닌의 뼈대로 사용되는 triterpene aglycon은 OSC의 한 종류인 Dammarenediol synthase에 의해 합성되어지고 cytochrome P450에 의해 다른 형태로 전환될 것으로 추측되어지고 있다. 이렇게 만들어진 triterpene aglycon에 glycosyltransferase에 의해 하나 또는 여러 개의 당이 결합됨으로써 최종적으로 다양한 종류의 인삼 사포닌이 만들어진다. 그러나 아직 인삼 사포닌의 생합성에 관계하는 이들 유전자들은 밝혀지지 않았다.

3. 인삼 사포닌의 생합성의 기능유전체 연구

3.1. 인삼 사포닌 생산 변이 모상근 line 선별

인삼 조직에 *Agrobacterium rhizogenes*를 감염 시키면 머리털 모양의 뿌리, 즉 모상근이 형성되어지는데 모상근은 각 line에 따라 생산되는 이차대사물의 양적 질적 변이를 보이는 것으로 알려져 왔다. 우리는 인삼 사포닌의 양적 질적 변이를 보이는 모상근들을 확보하기 위해 기능획득 변이를 유도할 수 있는 벡터를 사용하여 기능 획득 인삼 모상근들을 대량으로 확보하였다. 그리고 확보된 인삼 모상근에서 7개의

ginsenoside (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1)를 대상으로 하여 이들 ginsenoside의 양적 질적 변이를 LC/MS 및 HPLC를 이용하여 분석하였다. 지금까지 1,000개 이상의 인삼 모상근을 분석한 결과 대부분의 모상근 line에 있어서 인삼 사포닌의 함량 및 각 사포닌의 상대적 양은 유사함을 보였다. 그러나 일부 모상근 line은 인삼 사포닌이 전체적으로 증가하거나 또는 protopanaxadiol (Rb1, Rb2, Rc, Rd) 형 사포닌만이 전체적으로 증가하였으며, 일부 모상근은 특정 인삼 사포닌만이 특이적으로 증가함을 보였다 (그림 2, 그림 4). 이렇게 Ginsenoside profiling을 통해 선별된 인삼 모상근 line들은 인삼 사포닌 생합성 관련 유전자의 기능 연구에 중요한 재료로 사용되어지고 있다.

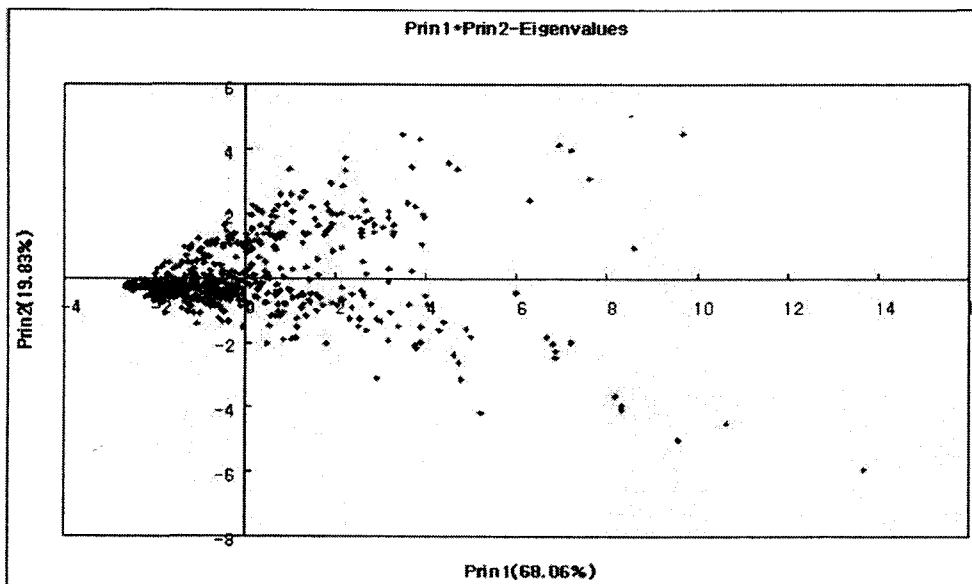


그림 2. 인삼 모상근의 사포닌 함량 변이 분석: PCA 분석

3.2. 인삼 유전자의 대량 발굴

ESTs (Expression Sequence Tags)는 약용식물과 같이 기초적인 유전학적 연구가 되어 있지 않는 식물체의 유전자원 확보에 가장 경제적이고 효율적인 방법으로 사용되고 있다. 따라서 지금까지 다양한 식물체로부터 많은 EST가 생성되고 있다. 우리는 인삼 사포닌 생합성 경로를 이해하고 관련 유전자들을 확보하기 위해 9개의 인삼 cDNA library를 제작하고 이들 cDNA library를 이용하여 총 21,155개의 EST를 생산하였다. 생산된 인삼 ESTs는 약 9,600개의 단일 유전자들을 포함한다.

생성된 인삼 EST의 약 25% (no hit)는 지금까지 보고된 유전자와는 유사성이

없으며 약 57%의 인삼 ESTs (known)만이 지금까지 보고 된 유전자와 높은 유사성을 갖고 있었다. (그림 3). 또 총 인삼 ESTs 중 약 15.8%가 이차대사물 생합성을 포함한 물질대사에 관련된 것으로 분석되었다.

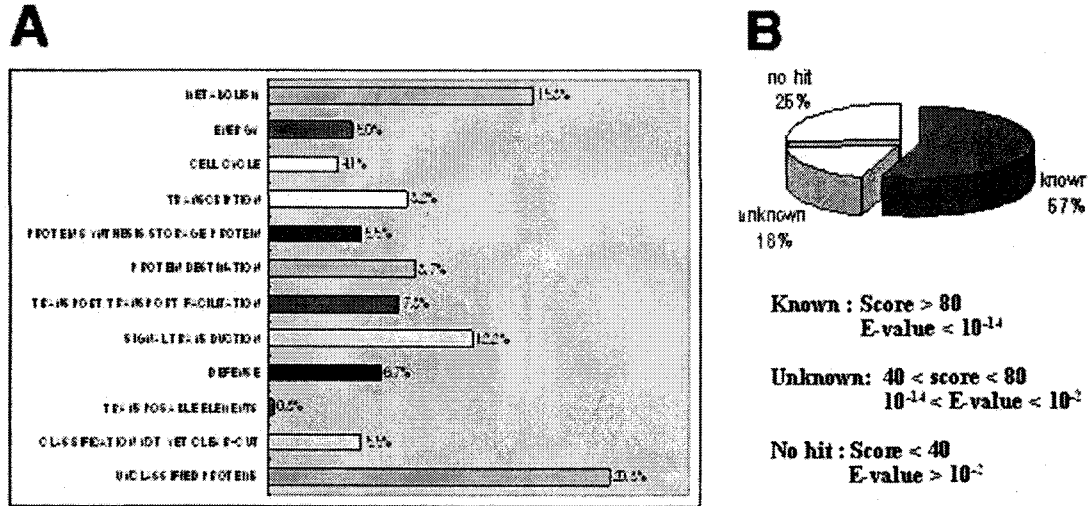


그림 3. A, 인삼 EST의 기능별 분류
 B, 인삼 EST의 분석

비록 인삼 사포닌 aglycone 합성에 관계하는 OSC (DS)는 밝혀지지 않았지만 식물로부터 세 가지의 다른 OSC (CS, AS, LS)가 분리되었는데 (표 2) DS는 이들 유전자와 높은 유사성을 가질 것으로 예상되어진다. 또 전체 genome 염기 서열이 밝혀진 애기장대의 경우 OSC 유전자는 최소한 13개로 구성되어 있으며, 다른 식물에서도 이들 유전자는 많은 유사 유전자로 구성되어 있을 것으로 판단된다. 우리는 지금까지 보고된 OSC와의 아미노산 서열 유사성 조사를 통해 4개의 인삼 OSC 유전자를 선별하였다. 4개의 인삼 OSC 중 2개는 보고된 인삼 cycloartenol synthase 및 β -amyrin synthase이며 나머지 2개는 새로운 OSC로 판단되어진다. 인삼 사포닌 aglycone 의 변형을 통해 최종적으로 다양한 사포닌 형성에 관계 할 것으로 예측되는 cytochrome P450 및 glycosyltransferase 유전자 역시 식물체에 매우 큰 유전자 집단으로 구성되어 있다. 이들 유전자는 triterpene aglycon 뿐만 아니라 다양한 기질의 변형에 관계하고 있다. 우리는 많은 인삼 cytochrome P450 및 glycosyltransferase 유전자 중에서 triterpene 이나 식물 이차대사물을 기질로

없으며 약 57%의 인삼 ESTs (known)만이 지금까지 보고 된 유전자와 높은 유사성을 갖고 있었다. (그림 3). 또 총 인삼 ESTs 중 약 15.8%가 이차대사물 생합성을 포함한 물질대사에 관련된 것으로 분석되었다.

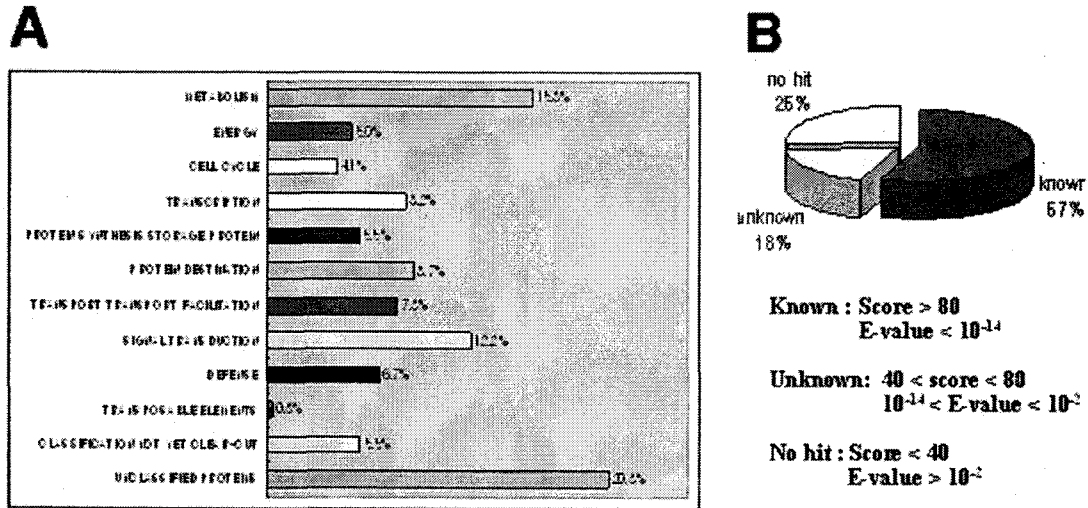


그림 3. A, 인삼 EST의 기능별 분류
B, 인삼 EST의 분석

비록 인삼 사포닌 aglycone 합성에 관계하는 OSC (DS)는 밝혀지지 않았지만 식물로부터 세 가지의 다른 OSC (CS, AS, LS)가 분리되었는데 (표 2) DS는 이들 유전자와 높은 유사성을 가질 것으로 예상되어진다. 또 전체 genome 염기 서열이 밝혀진 애기장대의 경우 OSC 유전자는 최소한 13개로 구성되어 있으며, 다른 식물에서도 이들 유전자는 많은 유사 유전자로 구성되어 있을 것으로 판단된다. 우리는 지금까지 보고된 OSC와의 아미노산 서열 유사성 조사를 통해 4개의 인삼 OSC 유전자를 선별하였다. 4개의 인삼 OSC 중 2개는 보고된 인삼 cycloartenol synthase 및 β -amyrin synthase이며 나머지 2개는 새로운 OSC로 판단되어진다. 인삼 사포닌 aglycone의 변형을 통해 최종적으로 다양한 사포닌 형성에 관계할 것으로 예측되는 cytochrome P450 및 glycosyltransferase 유전자 역시 식물체에 매우 큰 유전자 집단으로 구성되어 있다. 이들 유전자는 triterpene aglycon 뿐만 아니라 다양한 기질의 변형에 관계하고 있다. 우리는 많은 인삼 cytochrome P450 및 glycosyltransferase 유전자 중에서 triterpene 이나 식물 이차대사물을 기질로

사용할 것으로 예측되는 cytochrome P40 및 glycosyltransferase 유전자들을 선별하였다. 뿐만 아니라 아직까지 보고되지 않는 많은 인삼 특이적 유전자들을 확보 하였다.

3.3. 인삼 cDNA chip

초고속 DNA 염기서열 분석 기술의 발달과 함께 전체 genome 염기 서열은 물론 대량의 ESTs 확보가 가능해지면서 이제 DNA chip을 이용한 microarray 방법은 기능 유전체 연구에 있어서 가장 중요한 기술로 사용되고 있다. DNA chip의 이용은 수천에서 수만개의 유전자의 발현 패턴 분석을 동시에 가능하게 함으로써 특정 조직이나 환경조건에서 발현되는 유전자들을 대량으로 선별할 수 있다.

인삼 사포닌 생합성에 관련된 유전자를 확보하기 위한 또 다른 방법으로 우리는 cDNA chip을 이용하였다. 확보된 인삼 ESTs 분석을 통해 약 5,000개의 단일 유전자가 포함된 6.5K 인삼 cDNA chip을 제작하고 제작된 cDNA chip을 이용하여 ginsenoside를 대량으로 생산하는 인삼 모상근 line 및 ginsenoside 생산 변이 모상근 line을 대상으로 유전자 발현을 조사하였다. 약 100 여개의 유전자가 이들 선별 모상근 line에서 대조구로 사용한 모상근에서 보다 발현이 증가됨을 보였다 (그림4).

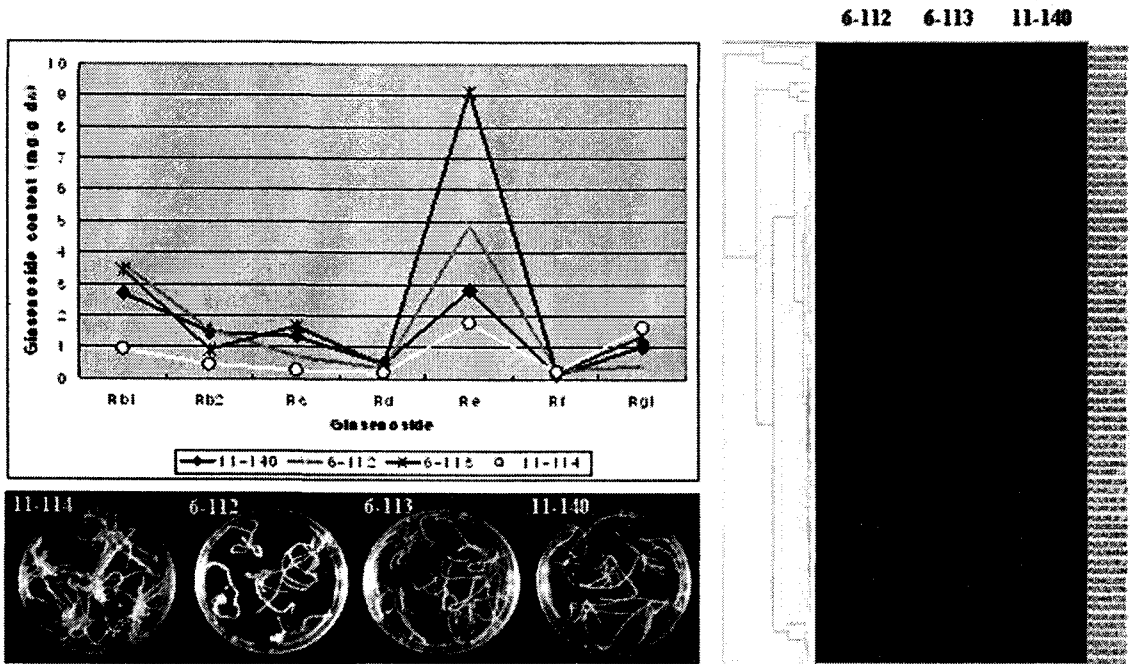


그림 4. 인삼 cDNA chip을 이용한 선별 변이 모상근의 gene expression profiling

또 지금까지 연구보고에 의하면 식물 호르몬 중 MeJA 처리시 사포닌 생산이 증가되는 것으로 알려지고 있다. 따라서 우리는 인삼 모상근을 이용하여 MeJA 처리 시간에 따른 유전자 발현 패턴을 조사하였다. 실험 결과 300개 이상의 유전자가 MeJA 처리에 의해 증가되는 양상을 보였다. 발현이 증가된 유전자는 OSC 유전자는 물론 cytochrome P450 그리고 glycosyltransferase 및 특정 transcription factor들이 포함하고 있다. 특히 우리는 cDNA chip을 이용한 gene expression profiling 분석을 통해 인삼 사포닌의 합성이 증가된 조건에서 함께 발현이 증가되는 transcription factor들은 확보 할 수 있었다. 앞으로 이들 유전자에 대한 연구는 단순한 인삼 사포닌 생합성 경로의 규명 뿐만 아니라 조절 기작을 이해하는데 큰 역할을 할 것으로 기대하고 있다. 지금까지 공통 기질인 2,3-oxidsqualene으로부터 sterol이 만들어지는 경로에 대해서는 많은 연구가 수행되어 왔지만 같은 기질로부터 sterol이 아닌 인삼 사포닌과 같이 다른 이차대사물의 생합성 경로의 규명 및 조절에 대한 연구는 많지 않기 때문이다.

3.3. 선별 유전자의 기능 연구

지금까지 OSC의 기능 연구를 위해서는 yeast Knock Out (KO) 돌연 변이 시스템이 가장 많이 사용되고 있다. Yeast의 경우 2,3-oxidsqualene를 기질로 사용하여 sterol 합성을 위해 요구되는 Lanosterol을 합성하는데 이 첫 단계에 관계하는 유전자가 Lanosterol synthase (LS) 이다 (표 1). LS의 기능이 제거된 yeast는 ergosterol 이 첨가되지 않는 배지에서는 성장할 수 없다. 이 yeast KO 돌연변이체에 식물 OSC 유전자를 도입하면 yeast는 ergosterol 이 첨가되지 않는 배지에서는 성장할 수 있으며 또 도입된 유전자 산물을 세포내에 축적하게 된다. 따라서 축적된 유전자 산물은 HPLC 등의 분석 기기를 이용하여 분석함으로써 최종적으로 선별한 유전자의 기능을 확인할 수 있다.

인삼 사포닌 생합성의 최종 단계에 관계하는 glycosyltransferase의 기능 분석을 위한 연구는 실험관내에서 생화학적 반응 실험과 함께 인삼 사포닌의 생산에 변이를 보이는 인삼 모상근 line을 이용하여 연구를 진행하고 있다.

4. 결론

식물에 존재하는 다양한 사포닌의 생합성 기작에 관해서는 식물의 생리학적 관점에서는 물론 산업적 중요성 때문에 오랫동안 많은 사람들이 관심을 가져왔다. 특히 인삼 사포닌은 다양한 약리 효과가 밝혀지면서 건강 보조식품은 물론

의약품으로의 개발을 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 인삼 사포닌의 생합성을 위해서는 사포닌의 뼈대가 되는 triterpene aglycone에 glycosyltransferase에 의한 다양한 당 결합은 물론 aglycone 자체의 변형도 수반되어 진다. 그러나 아직 triterpene aglycone 합성에 관계 할 것으로 생각되는 Mammarenediol synthase (DS)는 물론 aglycone의 변형에 관계되는 유전자들 역시 밝혀지지 않고 있다. 최근 다양한 식물 및 효모의 돌연변이체를 이용하여 다양한 OSC 유전자들을 분리하는 연구가 진행되고 있으며 또 chimeric OSC 유전자 조합을 이용하여 효소의 활성 및 OSC의 기질 및 산물 특이성에 대한 연구가 진행되고 있다. 우리는 사포닌 생합성에 변이를 보이는 다양한 인삼 모상근들을 기본 재료로 사용하여 사포닌 생합성 관련 유전자들 확보하기 위한 인삼 기능 유전체 연구를 수행하고 있다. 본 연구가 성공적으로 수행되면 확보된 사포닌 생합성 관련 유전자들은 인삼 사포닌의 대량 생산 및 특정 사포닌의 생산 등에 사용되어져 앞으로 인삼 사포닌을 이용한 산업에 크게 기여 할 것으로 기대한다.

Summary

Korea ginseng (*Panax ginseng* C.A Meyer) is an important medicinal plant. Its root has been used as an herbal medicine that provides resistance to stress and disease, and prevents exhaustion since the ancient time. Ginsenosides, glycosylated triterpene (saponin), are considered to be the main active compounds of the ginseng root. Despite of considerable commercial interests of ginsenosides, very little is known about the genes and their biochemical pathways for ginsenoside biosynthesis. This work will focus on the identification of genes involved in ginsenoside biosynthesis and the dissection of ginsenoside biosynthetic pathway using a functional genomics tool. Expression sequence tags (ESTs) provide a valuable tool to discovery the genes in secondary metabolite biosynthesis. We generated over 21,155 ginseng ESTs that is now sufficient to facilitate discovering the genes involved in ginsenoside biosynthesis such as oxidosqualene cyclase(OSC), cytochrome P450 and glycosyltransferase. With ESTs information, microarray technology will be used for the analysis of gene expression, and the identification of genes including transcription factors expressed in tissues under given experimental condition. Heterogous system such as yeast and plants will allow us to do the functional

analysis. And selected ginseng hairy root which show variation in ginsenoside production will be used as a material for functional analysis of candidate gene. Functional genomics approach will successfully accelerate gene discovery, and also provide promises of metabolic engineering for the ginsenoside production.