

기능성 식품 개발과 protein tyrosine phosphatase 1B 저해물질 탐색을 위한 식물 추출물탐색

최지숙¹, 김광훈¹, 양영택², 김재훈^{1*}
제주대학교 생명자원과학대학¹, 제주도농업기술원²

Screening of plant extracts for the inhibition of protein tyrosine phosphatase 1b and the development of functional foods

Ji-Sook Choi¹, Kwang-Hoon Kim¹, Young-Taek Yang², Jae-Hoon Kim¹
College of Applied Life Science, Cheju National University¹,
Jeju-do Agricultural Research & Extension Services²

ABSTRACT

Inhibition of Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves insulin sensitization, and PTP1B is emerging as a novel target for type 2 diabetes and obesity. The MeOH extract of plants of Jeju island were screened for the development fo PTP1B inhibitors. Of 60 extracts that were examined, 3 extracts showed about 80% inhibition of PTP1B activity compared to control at 0.4mg/ml concentration. In addition, 19 extracts inhibited PTP1B activity above 60% at the same extract concentration. These results show that natural products of Jeju island has a high potential for the development of PTP1B inhibitors and functional foods for diabetes and obesity.

서 론

혈중에 포도당 농도가 비정상적으로 상승된 상태가 지속되면 대사성 질환인 당뇨병을 유발한다. 합병증으로는 케톤산증, 고투압성 혼수증 등과 같은 급성 합병증과 신경장애, 망막증, 신증 등의 만성적인 당뇨병 합병증이 있으며, 지속되면 심근경색, 시력상실, 신부전증 등의 결과를 초래한다(1). 당뇨병은 인슐린 의존성인 제1형 당뇨병(Type 1 diabetes)과 인슐린 비의존성인 제2형 당뇨병(Type 2 diabetes)로 나눌 수 있다. 제1형 당뇨병은 인슐린을 생산하는 랑게르한스섬 베타세포의 파괴가 주 원인이며 지속적인 인슐린 투여가 필요하다(2). 전체 당뇨병 환자의 90% 이상에 해당하는 제2형 당뇨병에서는 인슐린 표적세포들이 인슐린에 대한 저항성이 증가하여 감수성이 감소되는 것이 특징적이며, 전 세계적으로 1억 명이상과 이 병과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 우리나라에서도 수명의 연장과 서양화된 생활 등에 의하여 급속히 증가하고 있다. 따라서 제2형 당뇨병의 원인을 밝혀내기 위한 많은 연구들이

* Corresponding author : Jae-Hoon Kim, Faculty of Biotechnolgy, College of Applied Life Science, Cheju National University, Aradong 1, Jeju 690-756, Jeju, Republic of Korea

국내외에서 진행되어왔다. 인슐린 저항성의 경우 표적세포에서의 인슐린 수용체의 down regulation이 중요한 원인들 중의 하나로 보고되고 있다(3). 인슐린 수용체는 인슐린과의 결합을 통하여 인산화되어 신호전달을개시하게 되는데, 이 때 인슐린 수용체와의결합이 억제되거나 탈인산화가 유도되면 인슐린 작용이 억제되는 것으로 알려져 있다. protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)은 인슐린 수용체를 탈인산화 시키면서 인슐린 수용체의 down regulation에 관여하는 것으로 알려지고 있다(4). 특히 PTP1B를 knockout 시킨 쥐를 이용한 실험 결과로서 혈중 글루코오스 농도가 정상 쥐의 경우보다 반 정도로 낮으며 간이나 골격근육등에서 인슐린에 대한 감수성이 증가하고 인슐린 수용체의 자기인산화 (autophosphorylation)이 증가하였다. 또한 체중 증가에 대한 저항도 보였다(5). 이러한 결과들은 PTP1B 저해제가 제2형 당뇨병과 비만 치료에 효과적인 가능성을 보여주는 것이다. 현재 학계와 산업계에서는 경구 섭취가 가능한 PTP1B 저해제개발에 집중적인 노력을 들이고 있다(6). 구와바 (Psidium guajava)의 추출물에서 PTP1B에 대한 저해활성을 가지고 있고, 당뇨병에 효과가 있다는 보고도 있다(7).

PTP1B는 435개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 N-말단에 250개 정도의 활성화 도메인(domain) 있고, PTP1B가 세포내 소기관인 소포체내에 존재하도록 하는 조절 도메인이 단백질의 C-말단에 위치하고 있다. 특히 C-말단의 35개의 아미노산이 소포체내에 존재하는데 필요하고 충분한 것으로 밝혀졌다. PTP1B의 C-말단에는 프롤린 (proline)이 많이 존재하는 영역이 존재하여 p130cas, FAK 등의 SH3 도메인을 포함하는 단백질들과 상호작용하는 것으로 알려지고 있다. 티로신 152/153을 포함하는 N-말단 도메인은 인슐린 수용체와 결합하는데 필요한 것으로 알려져 있다(8-10).

본 연구에서는 PTP1B 저해제 개발과 당뇨병 치료를 위한 기능성 식품 및 신약개발을 위하여 PTP1B의 활성화 도메인을 대장균에서 대량 발현하고 정제 한 후, 제주자생식물의 추출물을 대상으로 하여 저해활성을 측정하였다.

재료 및 방법

식물 추출물

식물자원을 군락지에서 채취하여 흐르는 물에 세척한 다음 정선한 후 55도를 유지하는 열풍건조기에서 1일간 건조하여 세절한 것을추출용 시료로 하였으며, 시료 전처리한 식물자원을 80% 메탄올로 80도에서 3시간 동안 환류추출(reflux)한 다음 rotavapor (Buchi R-220, Switzerland)로 45도에서 농축한 추출물을 영하 70도에서 동결한 후 freeze dryer(Ilisin PVDF10R, Korea)로 동결건조한 것을 검색용 식물 추출물 시료로 사용하였다.

인간유전자 PTP1b의 발현

인간 cDNA(Clontech)를 PCR로 증폭하여 얻어진 PTP1b 유전자를 pET 28 a vector (그림 1. novagen)의 NdeI과 BamHI 제한효소 자리에 넣은 후, sequenceing을 통하여 DNA 서열에 돌연변이가 없음을 확인하였고, 단백질을 대장균 BL21(DE3)에서 발현 시켰다. PTP1b 유전자를 포함하는 대장균을 18 ℃에서 OD₆₀₀값이 0.5~0.6에 도달할 때까지 키운 후 IPTG를 첨가하여 다시 4 시간 배양하였다.

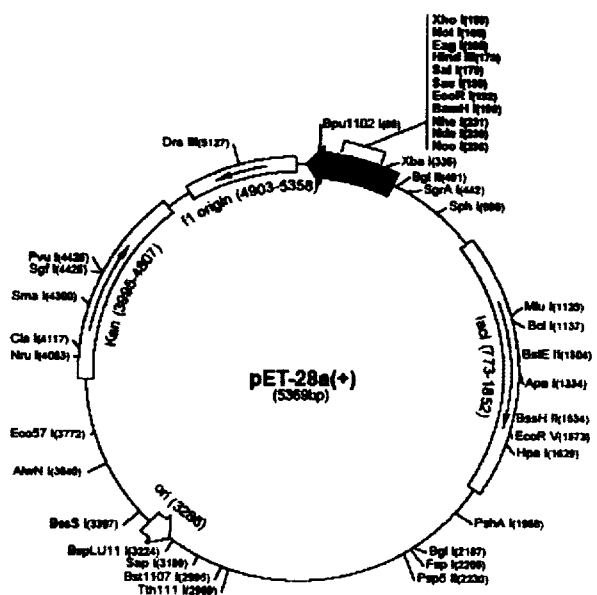


Fig. 1. The map of pET-28a (+) plasmid

PTP1b 단백질의 정제

단백질 발현이 유도된 대장균을 원심분리하여 배양액을 제거한 후, 가용화 완충용액 (50 mM Tris, pH 7.4, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)에 잘 현탁시켰다. 현탁액에 속의 대장균을 초음파 분쇄기를 사용하여 분쇄한 후, 세포 잔존물을 제거하기 위하여 원심분리 하였고 상층액을 얻었다. 발현된 단백질은 His-tag를 융합된 형태로 가지고 있으므로 His-tag 친화성 크로마토그래피 법으로 정제하였다. His-tag이 융합된 단백질을 다시 thrombin으로 절단하여 His-tag 부분을 제거한 후, CM-shepharose 이온교환 크로마토그래피 (Amersham Pharmacia)를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질의 농도와 순도는 protein assay (Bio-rad)와 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다.

PTP1b의 활성 측정

정제된 PTP1b 단백질 (0.5 µg)과 para-nitrophenolphosphate (pNPP)를 2 mg/ml (최종농도)로 포함하는 반응용액 (50mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA)에 MeOH를 첨가하여 0%에서 40%까지 변화를 주면서 PTP1b 활성과 MeOH 농도와의 관계를 조사하였다. 반응용액을 27 °C에 10분 간 두어 반응을 시킨 후, 2N NaOH를 100 µl를 반응용액에 첨가하여 반응을 정지시켰다. pNPP의 분해생성물인 pNP는 405 nm에서 흡광도를 나타내기 때문에, ELISA leader를 이용하여 흡광도를 측정하므로써 활성을 측정하였다.

추출물의 PTP1b의 저해 활성 측정

다양한 식물에서 추출한 70% 메탄올 추출물 0.4 mg/ml (최종농도)을 포함하는 반응용액 100µl에 pNPP 2 mg/ml (최종농도)와 PTP1B (0.5 µg) 첨가한 후, 27 °C에서 10분간 반응을 시켰고, 이후의 처리는 PTP1b 활성측정과 동등한 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. PTP1B 단백질 발현 및 활성 확인

PTP1B 단백질을 대량으로 얻기위하여 PTP1B 435개의 아미노산 중 N-말단 293개 아미노산을 포함하는 영역을 인간 cDNA를 주형으로 하여 Polymerase Chain Reaction으로 증폭하였다. 증폭된 영역에는 활성화 도메인 (N-말단 250개 아미노산 영역)이 포함되고 있어 충분한 활성이 있을 것으로 예상되었다. PTP1B 재조합 단백질은 대장균 배양액 1L 에서 10mg 이상을 정제된 상태로 얻을 수 있어서 발현율에 있어서 비교적 좋은 결과를 보여주었다(Fig. 2). 정제된 PTP1B 단백질을 활성을 확인하기 위하여 pNPP를 기질로 하여 실험을 실시하였다. pNPP가 분해되어 생성되는 pNP는 405 nm에서 강한 흡광도를 나타낸다. PTP1B 농도가 20nM 정도에서 0.5 정도의 흡광도, 40nM에서 1이상의 흡광도를 나타내고 있어, 충분한 활성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 또한, Phosphatase의 일반적인 저해제로 알려진 vanadate에 의해서 효소활성이 저해되는 것은 발현된 단백질은 phosphatase로서의 활성을 갖고 있다는 것을 의미한다(Fig. 3). MeOH 식물 추출물을 사용한 저해활성실험을 위하여 MeOH가

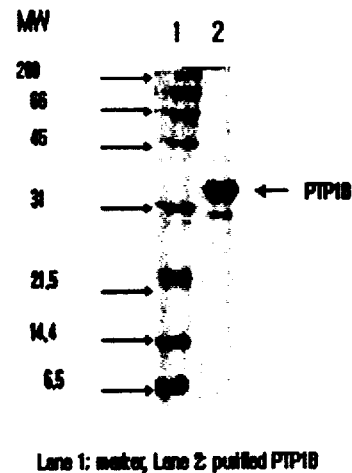


Fig. 2. PTP1B fragment containing residues 1-293 was expressed in E.coli and purified. The purified protein (1µg) was analyzed by SDS-poly acrylamide gel.

PTP1B 활성에 미치는 영향을 조사하였다. MeOH의 농도를 0에서부터 40% 까지 높인 결과, PTP1B 활성은 MeOH가 없을 때와 비교해서 30% 농도에서 6배 정도가 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 PTP1B를 이용하여 Phosphatase의 저해제를 탐색하는 데 있어서, 소량의 효소로서 가능하다는 것을 의미하며, High Throughput Screeing (HTS)을 하는데 있어서 상당한 비용절감이 가능할 것으로 예상된다.

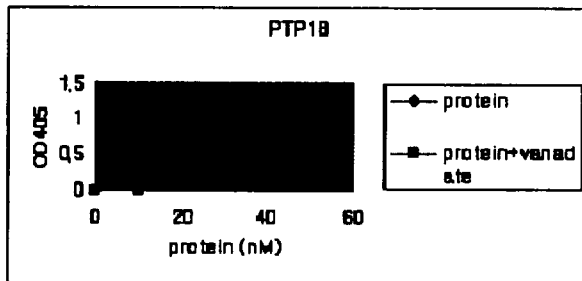


Fig. 3. The purified PTP1B protein was assayed with pNPP as a substrate. After 10 min incubation at 27 °C, reaction was stopped by adding NaOH. Absorbance of was determined with ELISA Leader at 405 nm. The inhibition of PTP1B activity also determined With vanadate, a known phosphatase inhibitor.

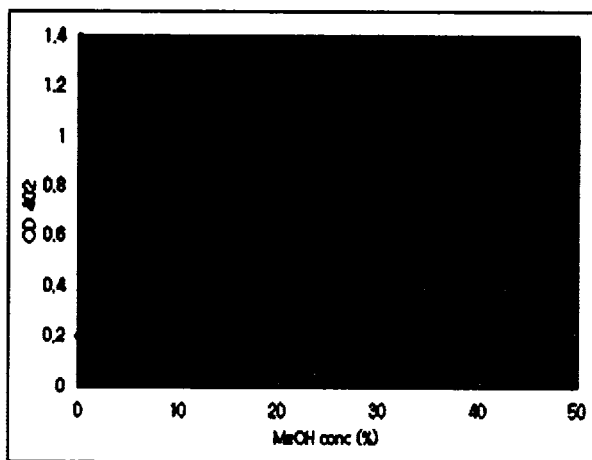


Fig. 4. The effect of MeOH on the PTP1B activity was determined by changing MeOH concentration in reaction buffer.

2. 식물추출물의 PTP1B에 대한 저해 활성

제주지역에서 자라는 식물자원에서 추출하여 얻은 60 종의 추출물 (tabel 1) 시료를 최종농도 1mg/ml로 70% MeOH에 녹인 후 사용하였다. 50 종의 식물에서 추출되었으며, table 1에서 보여주는 것과 같이 일부 식물의 경우 지상부, 지하부 등이 구분되어 추출되었다. 실험에 사용된 조건에서 참가시나무(*Quercus salicina*)는 추출물을 넣지 않은 대조군과 비교하였을 때 상대적으로 0.122 정도로 좋은 저해활성을 보였다. 참가시 나무는 쌍떡잎식물로 참나무목 참나무과의 상록교목으로 한국에서는 제주도, 울릉도, 대흑산도, 청산도 등지에 분포하며, 국외로는 일본 등지에 분포한다. 참가시나무 성분은 당뇨와 직접적인 관련이 있다는 보고는 없으나 담석, 신장 결석, 요로결석 등 결석에 특효가 있는 것으로 알려져 있고 강장효과도 있는 것으로 보고도 있어 개발 가능성이 있다고 할 수 있다. 복분자(*Rubus coreanus*) 줄기에서 추출한 성분은 PTP1B 활성을 대조군비 0.124로 저해하여 참가시나무 추출물과 비슷한 정도의 저해활성을 보였다. 복분자 열매의 경우 당분본초에 자양강장에 도움을 준다고 되어있으며, 본초종신록에는 간과 신장을 보호한다고 되어 있다. 잎, 줄기 부분에서도 다양한 성분이 포함되어 있어, 고혈압이나 동맥경화에 효과가 있다는 보고가 되어있어, 본 연구와 관련한 기능성 식품개발 가능성이 있다고 보여진다. 상동나무(*Sageretia theezans*) 줄기 추출물에서도 비교적 높은 저해활성을 보였다. 상동나무는 한국에서는 제주도를 포함하는 흑산도 이남의 섬 지역에 분포하고 있으며 일본, 타이완, 중국, 인도 등지에서도 볼 수 있고, 전통의학에서는 옷독에 의하여 생기는 피부병에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이외에도 본 연구(fig. 5)에서 보듯이 애기달맞이꽃(*Oenothera lamarckiana* Ser.) 지상부, 비단풀(*Ceramium kondoi*) 지상부, 제주광나무(*Ligustrum lucidum*) 가지, 아왜나무(*Viburnum awabuki*) 가지, 청미래덩굴(*Smilax china*) 줄기, 이질풀(*Geranium nepalense* subsp. *thunbergii*) 지상부, 구상나무(*Abies koreana*) 지상부, 예덕나무(*Mallotus japonicus*) 줄기, 암대극(*Euphorbia jolkini*) 지상부, 갯메꽃(*Calystegia*

Table 1. MeOH Extracts of plants

번호	sample 명칭	번호	sample 명칭	번호	sample 명칭
1	개산초 (Zanthoxylum planispinum) - 가지	21	문주란 (Crinum asiaticum var. japonicum) - 가지	41	애기땅빈대 (Euphorbia supina) - 지상부
2	개산초 (Zanthoxylum planispinum) - 잎	22	문주란 (Crinum asiaticum var. japonicum) - 열매	42	석창포 (Acorus gramineus) - 뿌리
3	문주란 (Crinum asiaticum var. japonicum) - 잎	23	이질풀 (Geranium nepalense subsp. thunbergii) - 지상부	43	갯완두 (Lathyrus japonica) - 덩굴
4	겨우살이 (Viscum album var. coloratum Mistle) - 지상부	24	사상자 (Cnidium tachiroei) - 지상부	44	예덕나무 (Mallotus japonicus) - 줄기
5	애기달맞이꽃 (Oenothera lamarckiana Ser.) - 지상부	25	사상자 (Cnidium tachiroei) - 지하부	45	상동나무 (Sageretia theezans) - 지상부
6	비단풀 (Ceramium kondoi) - 지상부	26	곰취 (Ligularia fischeri) - 지상부	46	갯방풍 (Glehnia littoralis) - 꽃
7	제주광나무 (Ligustrum lucidum) - 가지	27	미역취 (Solidago virga-aurea var. asiatica) - 지상부	47	암대극 (Euphorbia jolkini) - 지상부
8	아왜나무(Viburnum awabuki) - 가지	28	구상나무 (Abies koreana) - 지상부	48	왕모시풀 (Beohmeria holosericea Blume) - 줄기
9	으아리(Clematis mandshurica) - 덩굴	29	매발톱나무 (Berberis amurensis) - 지상부	49	갯메꽃 (Calystegia soldanella Roem. et Schult.) - 덩굴
10	하늘타리 (Trichosanthes kirilowii) - 덩굴	30	굴거리나무 (Daphniphyllum macropodum) - 가지	50	양하 (Zingiber mioga)-화퇴
11	아왜나무(Viburnum awabuki) - 열매	31	익모초 (Leonurus sibiricus) - 꽃	51	갯기름나무 (Peucedanum japonicum) - 지상부
12	제주광나무 (Ligustrum japonicum) - 열매	32	복수초 (Adonis amurensis) - 지상부	52	갯강활 (Angelica MAKINO) - 지상부
13	번행초 (Tetragonia tetragonoides) - 지상부	33	뱀톱 (Lycopodium serratum Thunb.) - 지상부	53	갯메꽃 (Calystegia soldanella Roem. et Schult.) - 지하부
14	익모초 (Leonurus sibiricus) - 지상부	34	도독놈의 지팡이 (Sophora flavescens) - 지상부	54	참가시나무 (Quercus salicina) - 가지
15	익모초 (Leonurus sibiricus) - 지하부	35	도독놈의 지팡이 (Sophora flavescens)- 지하부	55	갯기름나무 (Peucedanum japonicum) - 뿌리
16	청미래덩굴 (Smilax china) - 줄기	36	실거리나무 (Caesalpinia japonica) - 잎	56	석창포 (Acorus gramineus) - 지상부
17	먹구슬나무 (Melia azedarah var. japonica) - 꽃	37	굴거리나무 (Daphniphyllum macropodum) - 잎	57	돌의 (Gynostemma pentaphyllum) - 덩굴
18	쇠비름 (Portulaca oleracea Purslane)	38	실거리나무 (Caesalpinia japonica) - 가지	58	등근하늘타리 (Trichosanthes kirilowii) - 열매
19	제비꽃 (Viola spp) - 지상부	39	복분자(Rubus coreanus) - 줄기	59	갯 방풍 (Glehnia littoralis) - 뿌리
20	고사리 (Pteridium aquilinum var.) - 지상부	40	누리장나무 (Clerodendron trichotomum) - 가지	60	탐라오갈피 (Eleutherococcus sessiliflorus) - 뿌리

soldanella Roem. et Schult.) 지하부, 돌의 (Gynostemma pentaphyllum) 덩굴 등에서도 20~30%에 이르는 저해활성을 보이고 있어 이들에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 개초산(Zanthoxylum

planispinum) 가지, 겨우살이(Viscum album var. coloratum Mistle), 하늘타리(Trichosanthes kirilowii) 덩굴, 아왜나무(Viburnum awabuki) 열매, 실거리나무(Caesalpinia japonica) 잎, 애기땅

빈대(*Euphorbia supina*) 지상부, 양하(*Zingiber mioga*), 탐라오갈피(*Eleutherococcus sessiliflorus*) 뿌리 등에서는 30~40%에 이르는 저해활성을 보이고 있어 제주 자생식물에 대한 적극적인 연구가 필요한 것으로 사려된다.

적 요

단백질 티로신 탈인산화효소 (PTP1B)의 저해는 인슐린의 감수성을 증가시키므로 PTP1B는 제 2형 당뇨병과 비만에 대한 타겟으로 주목받고 있다. 제주지역의 식물 추출물을 이용하여 PTP1B 저해제 개발을 위하여 검색하였다. 60개의 추출물 중 3개의 추출물의 경우 대조군과 비교를 하여 0.4mg/ml의 농도에서 80% 이상의 저해활성도를 나타내었다. 추가적으로 19개의 추출물이 60% 이상의 저해활성을 보였다. 이러한 결과는 제주지역의 식물들은 PTP1B 저해제 또는 당뇨 및 비만에 대한 기능성 식품개발에 있어서 높은 가능성을 가지고 있는 것을 보여준다.

사 사

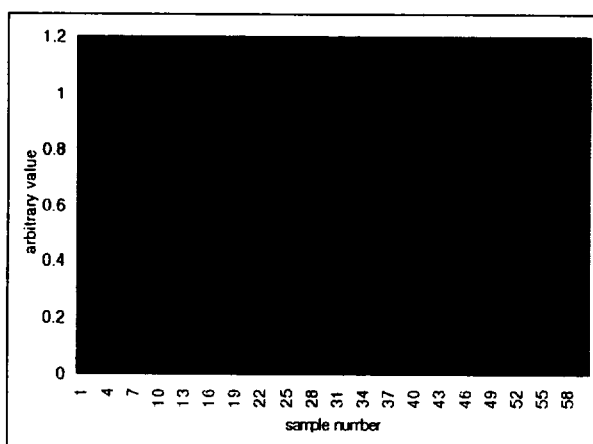


Fig. 5. The inhibition of PTP1B activity was assayed with extracts of plants. Arbitrary value in X-axis means [the value of OD405 of sample with extract] / [the value of OD405 of sample without extract].

본 연구는 산업자원부에서 지원하는 제주대학교 기능성 식품사업단의 지원으로 이루어진 것입니다.

This work was supported by MOCIE grants from Functional Foods Development Center, Cheju National Univ.

인 용 문 헌

1. Idris I, G.A. Thomson, J.C. Sharma. Diabetes mellitus and stroke. *Int J Clin Pract.* 2006 Jan;60(1):48-56.
2. Hoffman RP. Practical management of type 1 diabetes mellitus in adolescent patients: challenges and goals. *Treat Endocrinol.* 2004;3(1):27-39.
3. Sheehan MT. Current therapeutic options in type 2 diabetes mellitus: a practical approach. *Clin Med Res.* 2003 Jul;1(3):189-200.
4. Seely B.L., P.A. Staubs, D.R. Reichart, P. Berhanu, K.L. Milarski, A.R. Saltiel, J. Kusari, and J.M. Olefsky. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes.* 1996 Oct;45(10):1379-85.
5. Zabolotny J.M., K.K. Bence-Hanulec, A. Stricker-Krongrad, F. Haj, Y. Wang, Y. Minokoshi, Y.B. Kim, J.K. Elmquist, L.A. Tartaglia, B.B. Kahn, and B.G. Neel. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell.* 2002 Apr;2(4):489-95.
6. Ramachandran C and B.P. Kennedy. Protein tyrosine phosphatase 1B: a novel target for type 2 diabetes and obesity. *Curr Top Med Chem.* 2003;3(7):749-57.
7. Oh W.K., C.H. Lee, M.S. Lee, E.Y. Bae, C.B. Sohn, H. Oh, B.Y. Kim, and J.S. Ahn. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *J Ethnopharmacol.* 2005 Jan 15;96(3):411-5.

8. Aoki N, and T. Matsuda A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated STAT5a and STAT5b. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15;275(50):39718-26.
9. Xu G., C. Arregui, J. Lilien, and J. Balsamo. PTP1B modulates the association of beta-catenin with N-cadherin through binding to an adjacent and partially overlapping target site. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49989-97.
10. Liu F, M.A. Sells, and J. Chernoff. Transformation suppression by protein tyrosine phosphatase 1B requires a functional SH3 ligand. *Mol Cell Biol.* 1998 Jan;18(1):250-9.

