

버섯류의 렉틴 성분 개발연구(II)

야생 버섯류의 생리활성 물질, 렉틴 성분 검색

진 경 희 · 김 무 경 · 정 시 룬*

영남대학교 이과대학 · 약학대학*

(Received June 28, 1987)

Studies on Lectins from Mushrooms(II)

Screening of Bioactive Substance, Lectins, from Korean Wild Mushrooms.

Kyung Hee Jeune-Chung, Moo Kyung Kim and See Ryun Chung*

College of Science and College of Pharmacy,* Yeungnam University Gyeongsan 632, Korea

Abstract—Twenty species of higher fungi growing in the wild were collected and studied extensively for their lectin activities by using erythrocytes of human, rabbit and mouse blood. In total, 14 species demonstrated hemagglutination with some kinds of erythrocytes. Of twenty species, eight (*Boletus edulis*, *B. splendidus*, *Clavaria zollingeri*, *Lactarius subzonarius*, *L. volemus*, *Russula cutefracta*, *Pholiota squarrosa*, and *P. aspera*) were shown lymphoagglutination with murine splenic lymphocytes. Protein contents were estimated from the crude lectin fraction. Above mentioned eight species contained relatively high amounts of proteins than other mushrooms. Since these species had, coincidentally, high hemagglutinating activity as well, we could define them as lectin-containing mushrooms. Some species also contained mitogenic lectins toward murine splenic lymphocytes.

본 연구의 전보¹⁾에서는 야생버섯 16종을 수집하여 렉틴성분의 개발을 목적으로 각종 혈구세포 응집효과에 의한 검색시험, 단백질 분석, 당의 분석 그리고 이들 결과로부터 흥미있다고 판정된 양송이 *Agaricus bisporus*로부터 생리식염수 추출, 황화암모늄 침전분리, 이온교환 크로마토그래피 등의 방법으로 렉틴성분을 정제하고, 전기영동과 면역화학적 연구검토 등을 수행하여 보고한 바 있다.

이번 연구에서는 야생버섯 20종을 추가 수집하여 이들의 렉틴활성에 관한 여러가지 검색시험을 시도하였다.

최근들어 고등균류에 관한 관심이 높아져서 버섯류로부터 약효성분을 얻으려는 다양한 연구가 활발히 전개되고 있다.²⁻⁵⁾ 그러나 고등균류를 대상으로 렉틴성분을 연구한 보고는 대단히 드물다. 1969년 Sage 등⁶⁾과 1979년 Tsuda,⁷⁾ 그리고 1983년 Guillot 등⁸⁾이 버섯류로부터 렉틴성

분에 관한 연구결과를 보고한 바 있으나 한국산 버섯류의 렉틴성분에 관한 연구는 전보¹⁾에 불과하다. 렉틴의 생물화학적 특성을 이용하여 생명과학의 연구분야 뿐만 아니라 질병의 치료, 예방 등 의학 분야에서도 다양하게 이용될 수 있는 생리활성이 큰 이 물질을 우리나라에서 비교적 풍부한 야생버섯 자원으로부터 개발할 수 있는 의미가 있다고 믿어 이에 목적을 두고 연구한 몇가지 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험재료—본 연구에 사용한 버섯 20종은 1985년 8월부터 1986년 10월 사이에 팔공산, 가야산 및 영남대학교 캠퍼스내 야산에서 채집하여 인위적으로 건조시킨 것이다.

시약 및 기기—본 연구에 사용된 일반적인 시약은 특급 또는 일급시약을 시중에서 구입하였

고, bovine serum albumin, streptomycin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. U.S.A.)에서, $[6-^3\text{H}]$ thymidine (specific activity 2.0Ci/mmol)은 Amersham International Plc. (Buckinghamshire, England)에서, HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethane sulfonic acid)는 Dojin Chemical에서, EMEM(Eagles minimum essential medium), fetal bovine serum은 Gibco Lab. (Grand island, N.Y., U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 또한 본 연구 수행에 이용된 주요기기는 CO_2 -air incubator(Shel-Lab., U.S.A.), spectrophotometer(Perkin Elmer, U.S.A.), scintillation spectrometer(MINAXI Tri-Carb 4,000 series, Packard, U.S.A.), freeze dryer(DURA-DRY, FTS system, U.S.A.), high speed centrifuge(Hitachi, Japan) 등이었다.

렉틴성분 추출—과쇄한 시료를 Fig. 1에서와 같은 조작으로 3배량의 생리식염수 용액과 4°C 에서 24시간 동안 침출시킨 뒤, 8,000rpm으로 원심분리 하고 황화암모늄 침전분리 시켜 얻은 것을 crude lectin extract로 하였다.

혈구세포 응집 효과—머섯재료로부터 렉틴성분 함유여부를 알아보기 위해 각종 crude extract와 여러가지 혈구세포와의 응집현상을 조사하였다. 이 실험에 사용한 적혈구는 사람혈액 A, B, O, AB형과 집토끼, 마우스에서 채취한 것을 Chung 등^{9,10}의 방법에 의해 분리세척하여 3%로 조제하였고, 림프구는 마우스 비장(spleen)으로부터 분리한 것을 정 등^{11,12}의 방법에 의해 분리세척하여 5×10^7 cells/ml로 조제하여 사용하였다.

렉틴활성 검색시험은 정 등^{11,12}의 상법에 따라 microtiter plate에서 실시하였으며 적혈구 및 림프구 응집력은 세포응집력을 나타내는 시료용액의 최대 희석배수의 역수로 표시하였다.

단백질 함량 분석—각 시료의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로하여 Lowry 등¹³의 방법으로 정량하였다.

당 함량 분석—각종 시료의 당 함량은 전보¹⁾와 같은 anthrone 방법과 glucose를 표준품으로한 phenol-sulfuric acid 방법¹⁴으로 측정하였다.

림프구 분열자극 효과—수종의 시료로부터 림프구 분열자극 효과(mitogenic activity)가 있는지의 여부를 알아보기 위해 Pandolfino 등¹⁵의 방법을 응용하여 측정하였다. 실험에 사용한 각종 시료는 0.15M NaCl에 투석시키고 millipore ($50\mu\text{m}$)를 통과시켜 불순물을 제거한 후 사용하였다. Murine splenic lymphocytes는 앞에서와 같은 방법으로 분리세척한 후 2×10^6 cells/ml로 조제하였고, medium은 20mM HEPES와 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 함유한 EMEM(pH 7.2)으로 준비하였다.

림프구 배양은 U-shaped microtiter plate(Nunc. Co.)에서 duplicate로 실시하였다. 즉 적당한 농도의 시료용액($100\mu\text{l}$)을 동량의 medium으로 2배수로 희석 시킨 후, 동량의 림프구 및 20% fetal bovine serum을 각 well에 가하였다. 이를 CO_2 -incubator(5% $\text{CO}_2/95\%$ air)에서 36°C 로 48시간 배양시킨 후, $0.5\mu\text{Ci}$ 의 $[6-^3\text{H}]$ thymidine $10\mu\text{l}$ 씩을 각 well에 넣고, 24시간 더 배양시켰다. 배양이 끝난 림프구는 polypropylene filter funnel ($d=25\text{mm}$, Gelman Inc., Mich. U.S.A.)

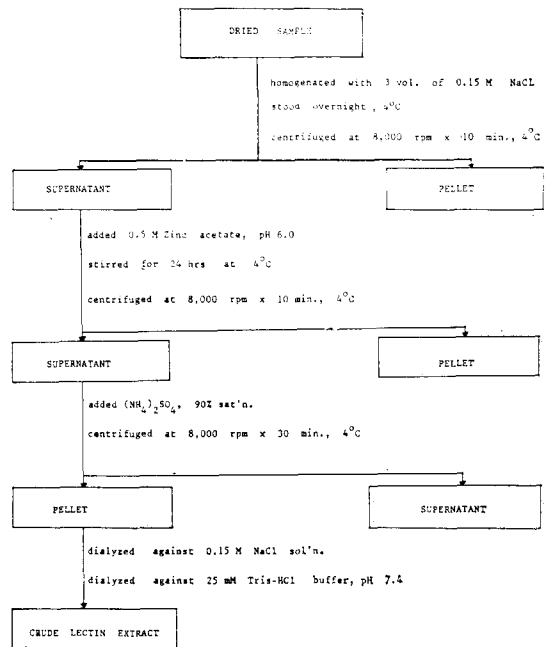


Fig. 1—Removal of hemolytic activity and isolation of crude lectin extract.

로 Whatman glass filter paper GF/C위에 여과 수집한 후, 이를 0.15M NaCl 20ml, 5% TCA 10ml, absolute methanol 10ml로 세척, 건조시켰다. 건조된 filter paper는 5ml scintillation cocktail solution(Pico-FLUOR 15 or INSTA-Gel, Packard)에 넣어 MINAXI Tri-Carb scintillation counter로 cell에 결합된 방사능을 측정하였다.

결과 및 고찰

적혈구 및 림프구 응집 효과—실험방법에서 Fig. 1과 같은 조작으로 얻은 20종 버섯의 시료에 대하여 사람 및 실험동물의 적혈구와 마우스

비장에서 얻은 림프구로 렉틴성분의 검색을 위한 응집현상을 시험한 결과는 Table I과 같았다. 시험한 20종의 버섯중 14종이 각종 적혈구 응집효과(사람, 8; 토끼, 13; 마우스, 7)를 나타냈다. 버섯류의 렉틴성분 검색을 보고한 전보¹⁾에서는 16종중 사람의 혈액과는 4종만이, 토끼 혈액과는 8종이 특이적인 응집효과를 나타내었고, 본 연구에서도 Table I에서 보는 바와 같이 토끼 혈액에 대한 특이성이 훨씬 더 많이 나타났다.

한편, 림프구 응집효과는 *Boletus edulis*, *B. splendidus*, *Clavaria zollingeri*, *Lactarius subzonarius*, *L. volemus*, *Russula cutefracta*, *Pholiota squarrosa*, *P. aspera*등 8종에서만 나타났고, 이

Table I—Blood cell specificities of mushroom extracts.

Family	Grude extracts	Scientific name	Korean name	Erythrocytes*						Murine splenic lymphocytes
				Human				Rabbit	Mouse	
				A	B	O	AB			
Agaricaceae		<i>Lepiota procera</i>	갓버섯	0	0	0	0	32	2	0
		<i>Lepiota pseudogranulosa</i>	흰여우갓버섯아제비	0	0	0	0	0	0	0
Amanitaceae		<i>Amanita aspera</i>		0	0	0	0	0	4	0
Boletaceae		<i>Suillus grevillei</i>	큰비단그물버섯	8	8	16	0	8	0	0
		<i>Suillus pictus</i>	좀황금비단버섯	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Boletus edulis</i>	그물버섯	8H	2H	2H	8H	256	2	16
		<i>Boletus splendidus</i>		0	0	0	0	8	0	32
Calostomataceae		<i>Calostoma japonica</i>	연지버섯	0	0	0	0	32	0	0
Clavariaceae		<i>Clavaria zollingeri</i>	자주싸리국수버섯	2	2	1	1	2	0	16
		<i>Clavulinopsis helvola</i>	좀노란참싸리버섯	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Clavulina cristata</i>	뿔싸리버섯	1H	1H	1H	1H	4	0	0
Corticaceae		<i>Stereum hirsutum</i>	꽃구름버섯	0	0	0	0	0	0	0
Lycoperdaceae		<i>Lycoperdon pyriforme</i>		0	0	0	0	0	0	0
Polyporaceae		<i>Ganoderma lucidum</i>	불로초(영지)	0	0	0	0	0	0	0
Russulaceae		<i>Lactarius subzonarius</i>	당귀젓버섯	4	4	8	8	8	4	8
		<i>Lactarius volemus</i>	배젓버섯	32	32	16	32	128	2	16
		<i>Russula cutefracta</i>	겉버섯	32	16	16	16	64	16	32
Strophariaceae		<i>Pholiota squarrosa</i>	비늘버섯	16	2	4	8	256	0	32
		<i>Pholiota aspera</i>		64	32	16	32	64	16	16
Tricholomataceae		<i>Tricholoma sejunctum</i>	쓴송이	4	4	4	4	16	0	0

* Numbers from 0 to 256 indicates the activity of agglutination by serial two-fold dilution method.

Agglutination is defined as the reciprocal of the dilution end point.

H: Hemolysis

Table II-The comparison of protein and carbohydrate contents in mushroom extracts.

Family	Crude extracts		Protein contents ($\mu\text{g/ml}$)	Carbohydrate contents (%)
	Scientific name			
Agaricaceae	<i>Lepiota procera</i>		109.2	0.008
	<i>Lepiota pseudogranulosa</i>		154.7	0.020
Amanitaceae	<i>Amanita aspera</i>		119.9	0.011
Boletaceae	<i>Suillus grevillei</i>		90.5	0.013
	<i>Suillus pictus</i>		181.5	0.024
	<i>Boletus edulis</i>		98.5	0.012
	<i>Boletus splendidus</i>		146.7	0.012
Calostomataceae	<i>Calostoma japonica</i>		109.2	0.029
Clavariaceae	<i>Clavaria zollingeri</i>		98.5	0.005
	<i>Clavulinopsis helvola</i>		119.9	0.043
	<i>Clavulina cristata</i>		149.4	0.076
Corticaceae	<i>Stereum hirsutum</i>		141.4	0.012
Lycoperdaceae	<i>Lycoperdon pyriforme</i>		141.4	0.012
Polyporaceae	<i>Ganoderma lucidum</i>		85.1	0.003
Russulaceae	<i>Lactarius subzonarius</i>		208.3	0.028
	<i>Lactarius volemus</i>		291.4	0.026
	<i>Russular cutefracta</i>		101.2	0.017
Strophariaceae	<i>Pholiota squarrosa</i>		119.9	0.031
	<i>Pholiota aspera</i>		133.3	0.069
Tricholomataceae	<i>Tricholoma sejunctum</i>		117.2	0.030

들은 모두가 적혈구 응집효과도 높았다. 다만, *Suillus grevillei*만 림프구 응집효과는 없고 적혈구에 대한 특이성만 나타낸 것이 특이하였다.

단백질 함량—20종 시료의 단백질 함량 분석 결과 일반적으로 소량의 단백질이 함유됨을 알 수 있었고(Table II), 앞에서 적혈구 및 림프구 특이성을 나타내어 렉틴이 함유된 것으로 판정할 수 있는 8종은 모두 단백질 함량이 비교적 높은 것으로 밝혀졌다.

당의 함량—버섯 시료 20종에 대한 당의 분석 결과 극히 미량이 함유되었음을 알 수 있었다(Table II). 그러나 본 실험의 목적하는 바가 시료로부터 당류의 분리, 정제가 아니라 렉틴성분과 공존하는 당단백질의 추구이므로 당의 함량이 낮은 것은 당연하다고 할 수 있다. 다만 20종의 버섯중 적혈구 응집력, 림프구 응집효과, 그리고 단백질 함량 등이 높은 것으로서 렉틴성

분이 함유되어 있다고 판정된 8종으로부터는 앞으로 렉틴을 순수하게 분리, 정제하여 이에 대한 당특이성(carbohydrate specificity)과 당의 함량, 결합된 당의 종류, 당결합 양상 등을 더욱 규명할 과제라고 하겠다.

림프구 분열자극 효과—렉틴의 여러가지 특성 중에도 대단히 흥미있는 하나가 림프구 분열자극 효과라고 할 수 있다. 1960년 Nowell¹⁶⁾이 PHA (*Phaseolus vulgaris* agglutinins) 렉틴의 mitogenic activity를 보고한 이래 렉틴의 이 성질에 관한 많은 시도가 있었다. 대부분의 mitogenic lectin은 T cell을 자극 분열하고 그 결과 자극된 cell은 활성이 증가되어 생물학적으로 활성이 큰 polypeptide인 lymphokines의 생성을 증진시키므로¹⁷⁾ 렉틴의 이 특성은 곧 암이나 기타 질병의 치료, 진단, 예방등에 응용할 무한한 가능성을 제시하고 있다.

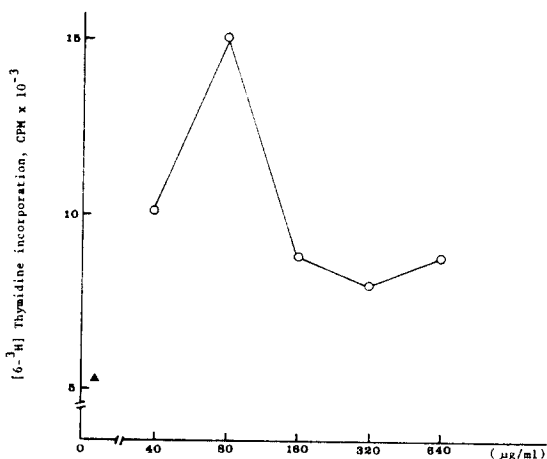


Fig. 2—Mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes by *Lactarius subzonarius* crude lectin. ▲, control.

본 연구에서는 앞의 실험 결과로부터 흥미있는 렉틴자원으로 판정된 8종에 대해 mitogenic lectin의 함유여부를 시험한 결과 Fig. 2와 같은 양상을 나타낸 *Lactarius subzonarius*와 Fig. 3의 *Russula cutefracta*에 함유된 렉틴성분은 80~160 µg/ml의 농도에서 비교적 강한 림프구 분열자극 효과를 나타내었다. 이 두 버섯은 같은 Russulaceae에 속하는 것이 흥미있는 내용이라 하겠다.

한편, *Lactarius volemus*, *Pholiota squarrosa*, *Pholiota aspera* 등 3종은 crude lectins의 상태에서 시험한 결과로는 림프구 분열자극 효과가 있는지 없는지 판정이 어려웠고, 그의 3종은 효과가 없는 것으로 밝혀졌다.

감사의 말씀

이 논문과 전보는 1986년도 문교부 학술연구 조성비 지원에 의하여 이루어진 것임을 밝히며 이에 감사드리는 바입니다.

문헌

- 1) Jeune-Chung, K.H. and Chung, S.R. Studies on lectins from Mushrooms(I): Isolation of lectin-like agglutinins from mushrooms, *J. Natural Sci.* 6, 219 (1986).
- 2) Kim, B.K., Park, E.K. and Shim, M.J. Studies

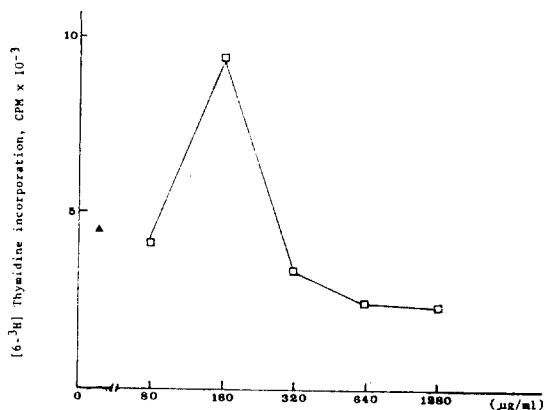


Fig. 3—Mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes by *Russula cutefracta* crude lectin. ▲, control.

on the constituents of the higher fungi of Korea (XXIII), *Arch. Pharm. Res.* 2, 145 (1979).

- 3) Min, H.K., Choi, E.C. and Kim, B.K. Studies on the constituents of the higher fungi of Korea (XVIII), *Kor. J. Mycol.* 8, 13 (1980).
- 4) Kang, C.Y., Lee, C.O., Chung, K.S., Choi, E.C. and Kim, B.K. An antitumor component of *Lae-tiporus sulphureus* and its immunostimulating activity, *Arch. Pharm. Res.* 5, 39 (1982).
- 5) Lee, C.O., Kim, H.S., Choi, E.S. and Kim, B.K. Studies on the constituents of the higher fungi of Korea (LV), *Kor. J. Pharmacogn.* 17, 23 (1986).
- 6) Sage, H.J., and Vazquez, J.J. Studies on a hemagglutinin from the mushroom *Agaricus campestris*, *J. Biol. Chem.* 242, 120 (1967).
- 7) Tusda, M. Purification and characterization of a lectin from mushroom, *Flammulina velutipes*, *J. Biochem.* 86, 1463 (1979).
- 8) Guillot, J., Genaud, L. and Damez, M. Purification and properties of two hemagglutinins of the mushroom *Laccaria amethystina*, *Biochemistry* 22, 5365 (1983).
- 9) Chung, S.R., Jeung-Chung, K.H. and Kim, K.A. Isolation, purification and characterization of phytohemagglutinating proteins from korean natural products, *Arch. Pharm. Res.* 3, 31

- (1980).
- 10) Chung, S.R. and Jeune-Chung, K.H. Isolation, purification and partial characterization of new lectins from Korean plant resources(I): Lectins from Leguminosae, *Korean Biochem. J.* **14**, 199 (1981).
 - 11) Chung, S.R., Hong, S.S. and Jeune-Chung, K.H. Isolation and purification of lectin from *Phaseolus radiatus*, *Yakhak Hoeji* **27**, 221 (1983).
 - 12) Chung, S.R., Suh, Y.A., So, M.S. and Jeune-Chung, K.H. Purification and immunochemical studies on L-PHA lectin, *Yakhak Hoeji* **28**, 139 (1984).
 - 13) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagents, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 - 14) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956).
 - 15) Pandolfino, E.R., Namen, A.E., Munske, G.R. and Magnuson, J.A. A comparison of the cell-binding characteristics of the mitogenic and nonmitogenic lectin from lima beans, *J. Biol. Chem.* **258**, 9203 (1983).
 - 16) Nowell, P.C. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes, *Cancer Res.* **20**, 462 (1960).
 - 17) Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J. The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, Academic Press, New York, 270 (1986).