

## 장수버섯 자실체로부터 분리한 항보체 활성 단백다당체의 화학적 분석

윤 상 홍\*

농업과학기술원 분자유전과

### Chemical Analysis of Acidic Proteo-heteroglycans with Anti-complementary Activity from the Hot-Water Extract of *Fomitella fraxinea*

Sang-Hong Yoon\*

National Institute of Agricultural Sciences and Technology, Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT:** The hot-water extract of fruiting bodies in *Fomitella fraxinea* had potent anti-complementary activities. After fractionation of water-soluble polysaccharides by DEAE-Sephadex A-25 column chromatography, major anti-complementary activity was concentrated into the FF-API among three polysaccharides (FF-NP, FF-API, FF-AP2). FF-API was fractionated into FF-API $\alpha$  and FF-API $\beta$  obtained from the adsorbed fraction and unadsorbed fraction by affinity chromatography using a ConA-sepharose 4B column, respectively. FF-API $\beta$ , which exhibited the highest anti-complementary activities had an IR absorption peak of 890  $\text{cm}^{-1}$ , and a M.W. of about 15,000 (gel filtration). Anti-complementary activity of FF-API decreased greatly by pronase treatment and periodate oxidation. FF-API $\beta$  responsible for potent anti-complementary activities of *Fomitella fraxinea* was an acidic protein-containing heteroglycan consisted of 48% glucose, 13% mannose, and 12% galactose as major component sugars, 9.6% protein, 6% uronic acids.

**KEYWORDS:** Anti-complementary activity, Anti-complementary proteoheteroglycan, *Fomitella fraxinea*

척추동물의 혈장 내에 있는 보체계는 외부 미생물의 감염으로부터 숙주를 방어하는 기능을 가진 이외에도 염증, 과민 반응, 화학주성 등의 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있으며 현재 C1~C9까지 9개의 보체성분과 조절인자 등 약 20여종의 단백질이 밝혀져 있다(Müller-Eberhard, 1988). 이러한 보체는 연쇄반응에 의해 차례로 활성화되어 궁극적으로 막공격 단백질(membrane attack protein), anaphylatoxins, chemotoxin과 같은 생물학적 활성이 있는 분자를 생성하거나 macrophage나 lymphocytes 세포를 활성화함으로써 외부 항원으로부터 숙주를 방어하는데 중요한 역할을

한다(Reid와 Porter, 1988).

자연계에 존재하는 일부 약초나 버섯에서 분리한 다당체는 항체가 관여하지 않고도 보체계의 대체경로를 열어줌으로써 보체들을 활성화시켜 생체의 면역기능을 조절하는 것으로 알려져 있으므로 최근 관심의 대상이 되고 있다. 특히, 이중에서도 당귀(*Angelica acutiloba*) 유래의 AR-arabinogalactan IIb-1, 자근(*Lithospermum euchromum*) 유래의 산성 다당인 LR-polysaccharide IIa, 쑥(*Artemista princeps*) 유래의 산성 heteroglycan인 AAF IIb-2 및 AAF IIb-3, 울무(*Coix lachrym-jobi var. ma-yuen*) 유래의 산성 heteroglycan CA-1과 CA-2 및 중성 glucan(Yamada 등, 1985, 1986a, 1986b, 1987), 알로에(*Aloe vera var.*

\*Corresponding author

*littoralis*) 유래의 고분자 다당체(Hart 등, 1989)가 강력한 항보체 활성을 가진 것으로 보고된 바 있으며 이 항보체 활성은 B세포 자극, interferon 생성 유도 같은 면역 조절 기능 및 항종양 효과와 연관되는 것으로 추측되어 진다(Okuda 등, 1973; Hamura 등, 1978; Shimura 등, 1983). 이러한 면역 기능의 작용 강도는 유효 다당체의 구성 성분과 구조 및 분자량의 차이에 기인한다는 일부 보고로 미루어 볼 때(Kumazawa 등, 1982), 다당체의 화학적 분석과 정확한 구조 해석은 이것의 약리성 기전을 구명하고 새로운 신약을 개발하는데 중요한 기초 자료를 제공해 줄 것이다.

따라서 본 연구에서는 전보에서 보고한(Yoon 등, 1998) 장수버섯 자실체로부터의 열수추출액의 약리성 중 항보체 활성 효과가 탁월한 유효 다당체를 분리 및 정제하고 그것의 화학적 분석을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공시 재료

국내에 자생하는 장수버섯(*Fomitella fraxinea* RDAGB-129)의 자실체를 채취하여 세척 및 세절, 풍건하여 사용하였다. 다당체의 분리와 정제를 위해 DEAE Sephadex A-25와 ConA-Sepharose 4B는 Sigma사, Toyopearl HW-65F는 일본의 Tosoh사 제품을 구입하여 사용하였다. 항보체 활성 검정을 위해 양의 감작 적혈구(IgM hemolysine sensitized sheep erythrocyte, EA cells)와 정상인의 혈청(normal human serum)은 일본 Biotest 연구소로부터 구입하여 사용하였다.

### 항보체 활성 검정

항보체 활성은 Kabat와 Mayer 방법(1961)에 의거하여 측정하였다.

### 항보체 활성 다당체의 정제

DEAE Sephadex A-25 column chromatography( $\Phi$  5×20 cm)에 의해 분리한 3종의 부분 정제 다당체 분말(FF-NP, FF-AP1, FF-AP2) 150 mg을 1차 용출 완충액 20 mM Tris(in 0.5M

NaCl, pH 7.4)에 용해하여 여지로 여과한 액을 ConA-Sepharose 4B column에( $\Phi$  1.5×20 cm) loading한 다음, 1차 용출 완충액으로 concanavalin과 친화성이 없는  $\beta$ 형 다당체가 완전 분리되게끔 충분히 용출한 뒤, 2차 용출 완충액(50 mM  $\alpha$ -methyl-D-glucoside in 0.05M phosphate buffer: pH 7.0)으로 concanavalin과 강한 친화성이 있는  $\alpha$ 형 다당체를 분리하였다. 이때 용출 속도는 30 ml/hr, 분획량은 2 ml/tube로 분주 받았으며 각 분획은 phenol-sulfuric acid 방법(Dubois 등, 1956)으로 당을 정량하여 해당하는 다당체 분획을 모아서 투석 및 동결건조하여 분말화하였다

### 다당체의 Gel electrophoresis

단백다당체의 gel 전기영동 분리는 Chaplin과 Kennedy의 방법(1986)에 준해 행하였다. 즉 gel matrix는 0.6% agarose와 1.2% acrylamide 혼합 gel을 사용하였고 전기영동용 완충액은 10 mM tris-acetate/0.25 mM sodium sulphate(pH 6.8)을 사용했으며 시료는 1 mg/ml로 용해하여 20  $\mu$ l 씩 loading한 뒤, gel내로 추적 dye가 진입할 때까지 60V로, 이후 120V로 증가하여 전기영동한다. 분리된 다당체 band는 PAS 염색법에 의해 염색하였다. 즉, 전기영동 gel 고정액(40% ethanol, 5% 빙초산 55%)에서 하루 밤 담근 뒤 0.7% periodic acid 용액에서 2시간 처리하고 0.2% sod. metabisulfite로 30분마다 용액을 교체하면서 2-3시간 반응하여 Schiff's 시약으로 12시간 염색시킨다(basic fuchsin 10 g/2 l D. W.+1N HCl 200 ml+17g sod. metabisulfite → charcoal로 혼합 → glasswool로 supernatant을 여과).

### 분자량 측정

Toyopearl HW-65F column chromatography로( $\Phi$  2.5×90 cm) gel filtration법에 의해 분자량이 밝혀진 dextran 고분자(T2000, T500, T70, T40, T10)인 각 표준의 용출량을 구하고 분자량에 대한 logarithm으로 표준곡선을 작성한 후 해당 다당체의 용출량을 구하고 표준곡선 상에서 분자량을 추정하였다. 용출조건은 0.1M phosphate 완충액(pH 7.0)으로 120 ml/hr의 속도로 용출시켰다.

### 아미노산 조성 분석

조다당체와 FF-AP1 분말 100 mg을 칭량하여 유리관에 넣고 2-mercaptoethanol을 함유한 6N HCl 5 ml를 가하고 질소가스를 충전하여 밀봉한 후, 110°C에서 24시간 가수분해시켰다. 얻어진 가수분해물을 여과하여 감압 농축 건조후, 0.02N HCl에 녹여 Hitachi model-835 amino산 자동분석기로 분석하였다. 얻어진 chromatogram을 표준 아미노산 chromatogram과 비교하여 peak area method에 의해 정량하였다.

### IR spectrum

해당 시료 0.5 mg과 KBr 0.5 mg을 섞어서 주발로 미세하게 갈아 압착기로 disc를 만들어 IR spectrophotometer에 의해 분석하였다.

### 당조성 분석

다당체를 구성하고 있는 단당류의 분석을 위해 해당 다당체는 trimethylsilylation하여 GLC로 분석하였다. 즉 각 다당체 분말 5 mg을 유리관에 넣고 4 ml의 4% HCl-methanol(4.65 ml acetyl chloride+100 ml dry methanol)을 가하고 질소가스를 충전시킨후 70°C에서 16시간 동안 methanol을 분해시켰다. 냉각 여과후 t-butylalcohol을 (20%, v/v) 가하고 시료를 vortex 혼합하여 실온에서 dry 질소가스로 건조시킨다. 5  $\mu$ l의 trifluoroacetic acid를 가하고 30초간 진탕하여 35°C에서 30분 반응시킨 후 Gas liquid chromatography (Hewlette Packard사, HP5890)로 분석하였다. HP1 capillary column과 FID(Flame Ionization Detector) 검출기를 사용하였고 주입(injection)온도는 210°C, oven 온도는 176°C, 검출조건은 176°C에서 15분으로 분석하였다. 구성당의 molar ratio는 peak 면적과 유도화 반응에 의해 전환된 당의 분자량에 의해 계산되었다.

### 다당체의 pronase 처리

조다당 40 mg을 10 mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 50 ml의 Tris-HCl buffer(pH 7.9)에 용해시킨 후 20 mg의 pronase를 가하여 37°C에서 48시간 반응시켰다. 이 반응액을 5분간 끓여 반응을 정지시킨 후

원심분리하여 얻은 상등액을 4°C에서 3일간 투석 및 동결건조하여 조다당체의 pronase처리 분말을 얻었다.

### 조다당체의 과요오드산 산화

조다당체 40 mg을 40 ml의 50 mM acetate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 후 50 mM NaIO<sub>4</sub> 20 ml를 가하여 4°C 암실에서 3일간 산화시켰다. 이 반응액에 ethylene glycol 5 ml를 가하여 잔존 과요오드산을 제거하고 1시간 동안 실온에서 방치한 후 3일간 투석하여 20 ml로 농축하였다. 농축액에 NaBH<sub>4</sub> 20 mg을 가하여 실온에서 12시간 교반하였으며 0.1M acetic acid로 중화한 후 methanol의 첨가와 증발을 반복하여 잔존 boric acid를 제거하고 투석 및 동결 건조하여 조다당체의 산화물을 얻었다.

## 결과 및 고찰

### 항보체 활성의 주 다당체 분리

Fig. 1은 장수버섯 자실체의 열탕추출액(FF-CP)으로부터 ion exchange chromatography에 의해 3종, affinity chromatography에 의해 6종의 다당체가 분리되는 과정을 도시한 것이다. 먼저 DEAE Sephadex A-25 column chromatography에 의해 분리된 3종의 다당체는 immuno double-diffusion법에 의해 모두 백색 침전선을 형성함으로써 미루어 보아 concanavalin A에 대해 친화성을 가지는 다당체 분획을 함유하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2). 따라서 ConA를 ligand로 한 ConA-

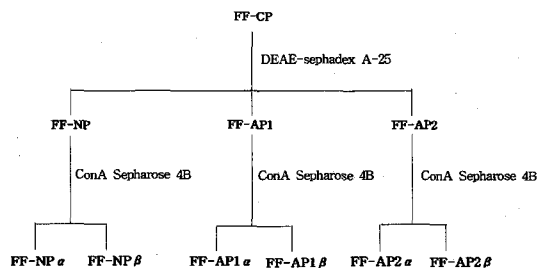
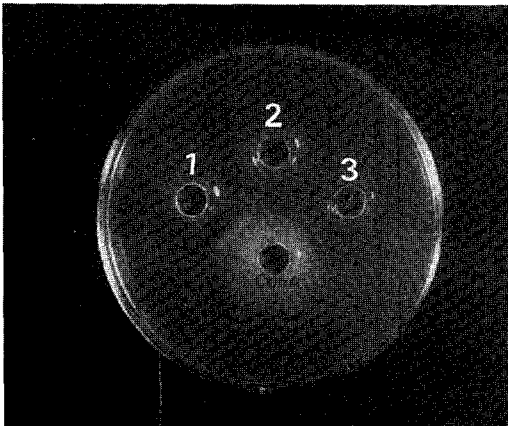


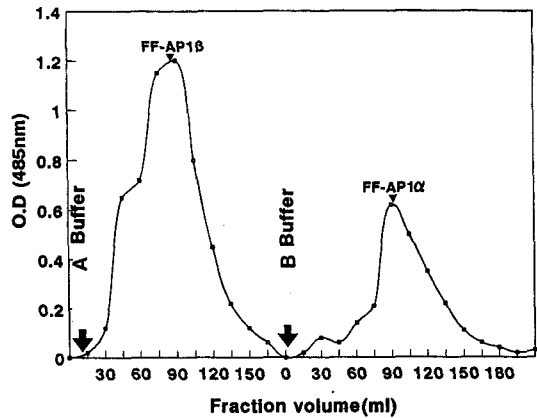
Fig. 1. Flow-chart describing the purification of neutral polysaccharide and acidic polysaccharides with ion-exchange and affinity chromatography.



**Fig. 2.** Double-diffusion pattern of ConA with heteroglycans.  
 #1: FF-NP, 2: FF-AP1, 3: FF-AP2  
 \*Portions (0.1 ml) of the polysaccharide solutions (0.5 mg/ml) were added to the peripheral wells. ConA extract (0.1 ml, 6 mg/ml) was added to the center well and precipitation bands were allowed to develop overnight at room temperature

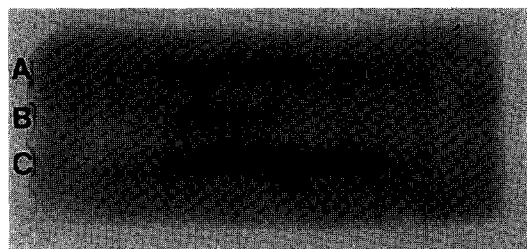
spharose 4B column chromatography를 사용하여 FF-NP로부터 FF-NP $\alpha$ 와 FF-NP $\beta$ , FF-AP 1으로부터 FF-AP1 $\alpha$ 와 FF-AP1 $\beta$ , FF-AP2로부터 FF-AP2 $\alpha$ 와 FF-AP2 $\beta$ 로 더 분리할 수 있었다. 일반적으로 Concanavalin A는 mannose와 강한 친화성이 있으므로  $\alpha$ -methyl D-glucoside 완충액에 의해 용출되는  $\alpha$ 형태의 다당체 분획은 친화성이 낮은 다당체  $\beta$ 형태 보다 mannose 함량이 상대적으로 훨씬 높을 것으로 예상되는데 이것은 구성당 조성 분석(Table 1)에서 확인할 수 있었다. 전보 (Yoon 등, 1998)에서 보고된 바와 같이 장수버섯 자실체의 항보체 활성 주 다당체인 FF-AP1은 Fig. 3과 같이 affinity chromatography에 의해 두 개의 다당체 분획으로 분리되었고 FF-AP1 $\alpha$ :FF-AP1 $\beta$ 의 함량 비는 약 1:4인 것으로 나타나 FF-AP1 $\beta$ 가 FF-AP1의 주 다당체임을 알 수 있었다. 그러나 중성다당체인 FF-NP는 FF-NP $\alpha$ :FF-NP $\beta$ 의 함량 비가 1.2:1.0으로 추정되고 약리적 활성이 인정되는 항보체 활성은 FF-NP $\beta$ 가 FF-NP $\alpha$ 보다 더 좋았다(자료 생략).

한편 FF-AP1 $\beta$ 와 FF-NP $\beta$ 는 gel electrophoresis로 분리되었는데 그 band 양상이 뚜렷하



**Fig. 3.** Fractionation of FF-AP1 on a column of ConA-sepharose CL4B ( $\phi$  2.5 $\times$ 50 cm) with 0.02M Tris buffer in 0.5M NaCl (A buffer, pH 7.4) followed by 0.05M  $\alpha$ -methyl D-glucoside in 0.05M phosphate buffer (B buffer, pH 7.0).  
 \*The carbohydrate content of each fraction was measured by phenolsulfuric acid assay.

지 않고 퍼진 형태로 나타났다(Fig. 4). 일반적으로 다당체에서의 정제는 분자량과 화학 구조가 동일한 동질의 분자들이 모인 단백질 정제와는 달리 분자량과 화학 구조가 유사한 분자들의 집합체이므로 엄밀한 의미에서 homogenous 하다고 할 수 없다. 이것은 복잡한 분자 구조를 가진 거대 분자량의 다당체가 추출 분리되는 과정에서 화학적 특성이나 구조가 유사한 다당체 단편들의 선별 제거가 매우 어렵기 때문이다. 그러나 Fig. 4에서 FF-AP1 $\beta$ 와 FF-NP $\beta$ 는 각각 다른 Rm치를 가진 퍼진 band 영역을 보여주었고 Toyopearl HW-65F gel filtra-



**Fig. 4.** Electrophoresis of FF-AP1 $\beta$  and FF-NP $\beta$  on polyacrylamide-agarose gels.  
 \*Proteoglycan bands were stained with 0.2% toluidine blue A: FF-CP, B: FF-NP $\beta$ , C: FF-AP1 $\beta$

tion chromatography에 의해 분리되었을 때 각각 대칭적인 하나의 peak만으로 분리되었으므로 비교적 정제된 다당체임을 알 수 있었다.

결론적으로 건조된 장수버섯 자실체 1 kg당 강력한 항보체 활성의 주 유효성분인 FF-AP1 $\beta$ 와 FF-AP1 $\alpha$ 를 각 39 mg과 11 mg 정도를 얻을 수 있었다.

**분리다당체의 항보체 활성 효과**

장수버섯 자실체 열수추출액의 탁월한 항보체 활성은 약산성 다당체인 FF-AP1에 기인하는 것으로 전보에서 보고된 바 있다. 일반적으로 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 70% 이상의 항보체 활성을 가진 다당체는 그 약리성이 통상적으로 인정된다고 알려져 있기 때문에(Yamada 등, 1992), 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 수준에서도 84%의 항보체 활성을 나타내는 FF-AP1은 최저 유효 약리성 기준에 비해 적어도 50배 이상의 보체 활성화 효과를 유발함을 알 수 있다. 또한 FF-AP1을 ConA-sepharose 4B affinity chromatography로 더 정제하여 얻은 FF-AP1 $\beta$ 와 FF-AP1 $\alpha$ 의 농도별 항보체 활성을 측정된 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 여기서 FF-AP1의 주 다당체이며 FF-AP1 $\alpha$ 보다 활성이 상대적으로 나은 FF-AP1 $\beta$ 는 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 70% 정도의 유효한 항보체 활성도를 보여줌으로써 최근까지 항보체 활성법에 의해 검색된 천연 다당체들중 가장 탁월한 것으로 알려진 자근(*Lithospermum euchromum*) 유래의 산성 다당인 LR-IIa에 못지

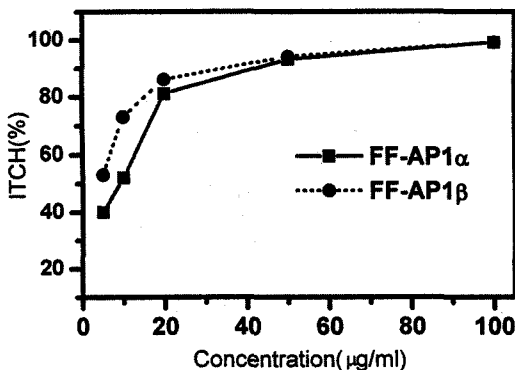


Fig. 5. Anti-complementary activities on FF-AP1 $\alpha$  and FF-AP1 $\beta$  separated by ConA sepharose 4B.

않은 강력한 효과를 보여주고 있다(Yamada 등, 1986b).

장수버섯 자실체의 총 수용성 다당체에서 약 60%를 함유하는 FF-NP로부터 분리된 FF-NP $\alpha$ 와 FF-NP $\beta$ 에 대한 항보체 활성 검정 결과, FF-NP $\beta$ 에서 FF-AP1 $\beta$ 보다 낮지만 유효한 항보체 활성이 인정되었다(자료 생략). 그러나 FF-NP의 높은 함유량을 감안할 때 장수버섯 자실체 열수추출액의 강력한 총 항보체 활성에 이것이 일부 기여할 것으로 믿어진다. 한편 단백다당체인 FF-AP1의 강력한 항보체 활성이 단백질과 다당체중 어디에서 기인하는지를 알기 위해 단백질 부분을 가수분해하는 pronase 처리와 다당부분을 산화시키는 periodate 산화반응에 의해 얻은 다당체로 항보체 활성 검정을 행한 결과, 모두 활성의 급격한 감소가 나타났기 때문에 단백질과 다당체 모두 항보체 활성의 필수적인 성분인 것으로 생각된다(Fig. 6). 이 결과는 생강, 당귀, 자근 및 쑥등에서 추출된 단백 다당체의 항보체 활성이 단백질보다는 다당체에 주로 기인한다는 보고(Yamada 등, 1986; Shin 등, 1992; Shin 등, 1993)들과 일치하지 않으나 최근 장수버섯 자실체로부터 분리한 단백다당체의 단백질 부분이 B 임파구의 항체 생성 증강에 관여한다는 Cho 등(1995)의 보고와 일치되는 결과이다. 여기서 조 등이 분리한 Fomitellan F가 본 실험에서 분리한

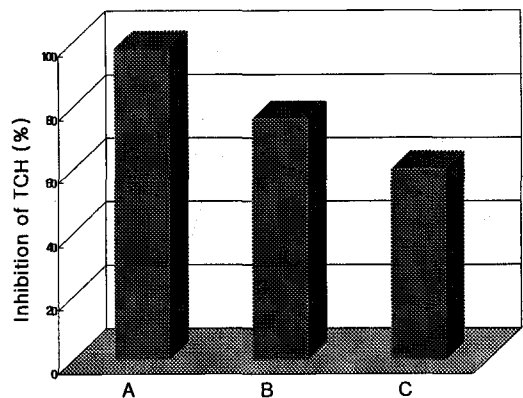


Fig. 6. Anti-complementary activities on periodate oxidation and pronase treatment of FF-AP1 (1000  $\mu\text{g/ml}$ ).  
 A: FF-AP1  
 B: Pronase digests of FF-AP1  
 C: Periodate oxidates of FF-AP1

FF-AP1과 유사한 기능을 가진 유사 물질인 것으로 추정된다. 보체의 강력한 활성화가 B세포의 항체 생성능 증강, macrophage 활성화에 따른 탐식능 고양, 백혈구 증식, 외래 항원에 대한 막공격 단백질 생성능과 같은 생체내 면역 반응을 야기시킨다는 보고(Reinhard 등, 1986; Gigli 등, 1968; Linscott 등, 1969; Luettig 등, 1989; Hart 등, 1989)들에 비추어 볼 때, FF-AP1 $\alpha$ 와 FF-AP1 $\beta$ 는 강력한 면역 증강 효과를 가진 새로운 약제로 개발 될 가능성을 높여주고 있다.

**항보체 활성 다당체의 화학적 특성**

항보체 활성의 주 유효성분인 FF-NP $\beta$ 와 FF-AP1 $\beta$ 의 분자량은 Toyopearl HW-65F gel filtration 방법에 의해 25,000과 15,000인 것으로 추정되었는데(Fig. 7), 이것은 브라질산 흰들버섯 (*Agaricus blazei*) 유래의 항암성 산성다당체인 FF-1-a- $\beta$ 의 분자량이 2,000,000인 것과 비교할 때 매우 분자량이 작았으나 중국산 황모버섯(*Hohenbuehelia serotina*) 유래의 항암성 FA-2 다당체가 25,000인 것과 유사하였다. 특히 강력한 항보체 활

성의 주 다당체인 FF-AP1 $\beta$ 의 분자량이 15,000임을 추정할 때, 구성당의 수가 최대 100개 이상이 되지 않음을 말해 준다. 따라서 기존 보고된 버섯 유래의 고분자 항암성 다당체의 약리성이 다당체의 분지도, 구성당 결합양식, 분자량, 3차 구조 등의 요인들과 밀접히 연관된다는 일부 보고에 비추어 볼 때(Sasaki 등, 1976; Yanaki 등, 1986; Maeda 등, 1988), 구성당의 수가 적다는 사실은 이것의 강력한 항보체 활성이 거대분자량을 요구하는 3차적 구조와 연관될 가능성이 희박함을 암시해 주는 것으로 생각되나 그 기전 구명은 보다 정밀한 실험이 뒷받쳐져야 될 것으로 믿어진다. 단백질다당체인 FF-AP1의 아미노산 조성을 분석한 결과 FF-AP1의 단백질 함량은 9.6%이며 약 16종의 아미노산이 탐지되었고 특히 glutamic acid와 aspartic acid 함량이 다른 아미노산들에 비해 상대적으로 높았다(Fig. 8). FF-AP1의 산성은 약 6% 정도의 uronic acid 함량 외에도 산성 아미노산의 높은 함량에 기인한다고 볼 수 있다. FF-NP $\beta$ 와 FF-AP1 $\beta$ 의 적외선 분광(Infra-red spectrophotometer) 분석에서 양 다당체 모두 3,400 cm<sup>-1</sup> 부근에서 O-H 신축 진동, 2,900 cm<sup>-1</sup> 부근의 C-H 신축 진동, 1,650 cm<sup>-1</sup> 부근에서 C-O 신축 진동, 1,000 cm<sup>-1</sup> 부근의 C-H와 C-O 변각운동과 같은 전형적인 다당체의 spectrum 양상을 나타내었다. 특히 FF-

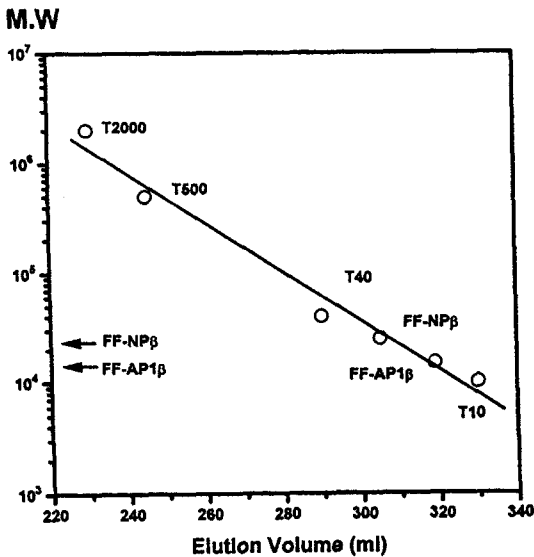


Fig. 7. A calibration curve for molecular weight determination of FF-NP $\beta$  and FF-AP1 $\beta$ .  
\*The used standard molecules are dextrans with molecular weights of 2 × 10<sup>6</sup>, 5 × 10<sup>5</sup>, 4 × 10<sup>4</sup>, and 1 × 10<sup>4</sup>.

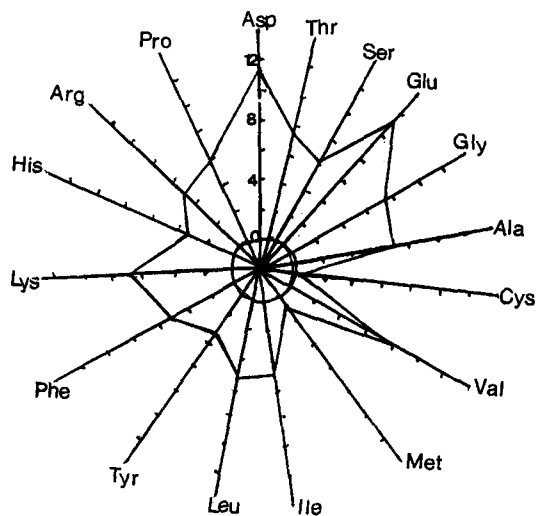


Fig. 8. Amino acid composition of FF-AP1.

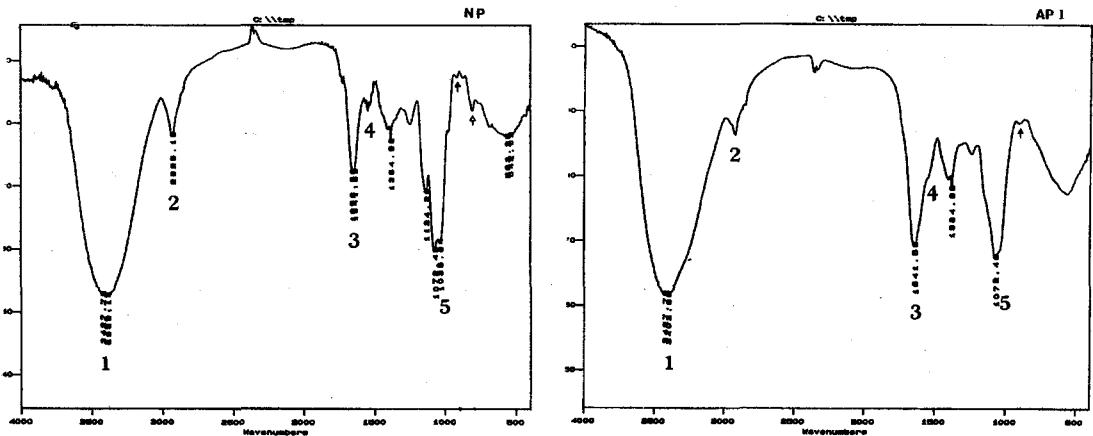


Fig. 9. Infra-Red spectra of FF-NP and FF-AP1.

\*Two arrows indicated the weak bands at  $890\text{ cm}^{-1}$  and  $790\text{ cm}^{-1}$

#1. O-H stretch:  $3405\text{ cm}^{-1}$ , 2. C-H stretch:  $2297\text{-}2973\text{ cm}^{-1}$ , 3. N-C=O stretch:  $1639\text{ cm}^{-1}$ , 4. C-H band:  $1544\text{-}1346\text{ cm}^{-1}$ , 5. C-O- stretch:  $1049\text{ cm}^{-1}$

Table 1. Chemical composition of 10 different polysaccharides partially-purified or purified from fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*

Constitutive monosaccharide	Kinds of polysaccharides									
	FF-CP	FF-NP	FF-NP $\alpha$	FF-NP $\beta$	FF-AP1	FF-AP1 $\alpha$	FF-AP1 $\beta$	FF-AP2	FF-AP2 $\alpha$	FF-AP2 $\beta$
Arabinose	0.2 <sup>#</sup> (-)*	- (-)	0.8 (0.32)	2.2 (0.14)	0.2 (-)	4.7 (0.24)	0.3 (-)	0.6 (-)	15.9 (0.83)	- (0.27)
Rhamnose	2.9 (0.08)	1.1 (0.1)	0.6 (0.24)	3.2 (0.20)	4.6 (0.09)	4.2 (0.21)	8.2 (0.17)	6.2 (0.12)	7.5 (0.39)	9.8 (0.27)
Fucose	9.5 (0.27)	15.6 (1.43)	23.5 (9.4)	16.4 (1.03)	4.0 (0.08)	9.5 (0.48)	4.0 (0.08)	3.8 (0.07)	4.0 (0.21)	4.7 (0.13)
Xylose	2.5 (0.07)	2.9 (0.27)	2.5 (1.0)	2.4 (0.15)	4.5 (0.09)	1.7 (0.09)	5.9 (0.12)	3.4 (0.07)	1.0 (0.05)	6.7 (0.18)
Mannose	23.8 (0.67)	26.9 (2.47)	26.1 (10.4)	23.6 (1.48)	17.0 (0.33)	28.7 (1.45)	13.4 (0.28)	14.8 (0.29)	29.9 (1.56)	30.4 (0.56)
Galactose	21.4 (0.60)	42.5 (4.00)	43.9 (17.6)	34.2 (2.15)	11.5 (0.22)	26.6 (1.34)	11.7 (0.24)	12.7 (0.25)	18.7 (0.97)	15.3 (0.42)
Glucose	35.4 (1.00)	10.9 (1.00)	2.5 (1.0)	15.9 (1.0)	51.4 (1.0)	19.8 (1.00)	47.9 (1.00)	51.6 (1.00)	19.2 (1.00)	36.3 (1.00)

#: % of constitutive monosaccharide

\*: molar ratio of constitutive monosaccharide.

NP와 FF-AP1 모두  $890\text{ cm}^{-1}$  부근에서 소 peak ( $\uparrow$ )를 가짐으로써  $\beta$  glucosidic 결합을 가진 다당체가 존재함을 보여주었고, 또 FF-NP는 FF-AP1에 없는  $790\text{ cm}^{-1}$  부근에서 소 peak ( $\uparrow$ )를 가짐으로써  $\alpha$ -glucosidic 결합을 가진 다당체가 FF-AP1에 비해 상대적으로 다량 함유함을 알 수 있었다(Fig. 9). 이것은 ConA-sepharose 4B affinity

chromatography에 의해 FF-NP $\alpha$ :FF-NP $\beta$ 의 함량비가 1.2:1, FF-AP1 $\alpha$ :FF-AP1 $\beta$ 의 함량비가 1:4로 분리된 결과에서 FF-NP내  $\beta$ 형태 다당체를 기준으로 한  $\alpha$ 형태 다당체의 상대적 함량이 FF-AP1 보다 훨씬 높았기 때문에 IR spectrum상에서 이미 예상된 결과가 실제 확인된 것이다.

장수버섯 자실체로부터 분리된 다당체들의 당조

성을 GLC로 분석한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 이들 중 항보체 활성의 주 다당체인 FF-AP1 $\beta$ 는 7종의 중성당과 소량의 uronic acid를 함유하고 있으며 주 중성당의 조성비는 rhamnose : fucose : xylose : mannose : galactose : glucose = 8.2 : 4.0 : 5.9 : 13.4 : 11.7 : 47.9이었으며, glucose에 대한 다른 당의 molar ratio는 glucose : mannose : galactose : rhamnose : xylose = 1.00 : 0.28 : 0.24 : 0.17 : 0.12 이므로 galacto-manno-glucan이라 할 수 있으며 주 구성 당인 glucose간은 IR 분석에서 지적했듯이  $\beta$ -glucosidic linkage로 연결되어 있리라 추정된다. 그러나 다른 강력한 항보체 활성의 하나인 FF-AP1 $\alpha$ 는 gluco-galacto-mannan으로 전혀 다른 구성당 조성을 가지고 있었다. 또한 장수버섯 자실체의 주 다당체이고 비교적 유효한 항보체 활성을 보유한 FF-NP $\beta$ 는 gluco-manno-galactan이며 uronic acid와 단백질 함량이 매우 낮았다. 지금까지 담자균으로부터 분리된 항암성 다당체는 수용성의 산성 단백다당체가 대부분이고 주로  $\beta$ -glucan으로 이루어지거나 비교적 간단한 형태의 heteroglycan임이 일반적이거나 항보체 활성이 FF-AP1 $\beta$ 처럼 뛰어난 것은 거의 없었다(Okuda 등, 1973; Hamuro 등, 1978). 또한 여러 식물체에서 분리한 강력한 항보체 활성 다당체들의 glucose 함량이 상대적으로 다른 당에 비해 대부분 매우 낮음을 고려해 볼 때 다양한 구성당에 의해 복잡한 구조를 가진 heteroglucan인 FF-AP1 $\beta$ 는 이들과 매우 상이한 당조성을 가진다는 점과 항보체 활성에 단백질 부분이 관여한다는 특성은 흥미로운 사실이다.

이상의 결과들에서 장수버섯 자실체 유래의 강력한 항보체 활성 다당체인 FF-AP1 $\alpha$ 와 FF-AP1 $\beta$ 는 숙주매개에 의한 면역반응들을 유도하여 생체내 면역기능을 강화시켜주는 주 원인물질로 추정되며 더 나아가 항암효과도 기대된다.

## 적 요

장수버섯 자실체로부터 분리된 강력한 항보체 활성 다당체인 FF-AP1을 정제하고 이것의 화학적 특성을 구명하기 위해 본 실험을 수행한 결과는 다음

과 같다. ConA-Sepharose 4B affinity chromatography에 의해 FF-AP1은 FF-AP1 $\alpha$ 와 FF-AP1 $\beta$ 로 더 분리되었으며 이 중 항보체 활성의 주 유효 다당체인 FF-AP1 $\beta$ 는 10  $\mu$ g/ml 농도에서도 약 70%의 항보체 활성도를 나타내었다. FF-AP1 $\beta$ 는 약 9.6%의 단백질을 함유한 산성다당체이며 glutamic acid와 aspartic acid의 함량이 상대적으로 다른 아미노산들에 비해 높았다. 이것의 분자량은 gel filtration법에 의해 15,000인 것으로 추정되었고 적외선 분광 분석에서 890  $\text{cm}^{-1}$  부근의 소peak를 탐지함으로써  $\beta$  glucosidic 결합의 존재를 확인하였다. Gas chromatography에 의한 구성당 조성 분석 결과, 주 구성당이 glucose, mannose, 및 galactose인 galacto-manno-glucan이었고, 소량의 rhamnose, xylose, fucose와 uronic acid도 탐지되었다.

## 참고문헌

- Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. 1986. Carbohydrate analysis: a practical approach. IRL Press. p 124-126.
- Cho, S. M. ee, J. H., Han, S. B., Kim, H. H., Yu, S. H. and Yoo, I. D., 1995, Immunostimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea* I.: Characterization of polysaccharides extracted with neutral sodium chloride solution. *Kor. J. Mycol.* 23: 332-339.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Gigli, I. and Nelson JR. R. A. 1968. Complement dependent immune phagocytosis. *Exp. Cell. Res.* 51: 45-67.
- Hamuro, J., Hadding, U. and Bitter-Suermann, D. 1978. Solid phase activation of alternative pathway of complement by  $\beta$ -1,3-glucans and its possible role for tumor regressing activity. *Immunology.* 34: 695-705.
- Hart, L. A't, van den Berg, A. J. J., Kuis, L., van Dijk, H. and Labadie, R. P. 1989. An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of *Aloe vera*. *Planta medica.*



- 55: 509-512.
- Kabat, E. A. and Mayer, M. M. 1961. Complement and complement fixation in *Experimental Immunochimistry*, 2nd edition, Charles, C., Thomas publisher, Springfield, p 459.
- Kumazawa, Y., Mizunoe, K. and Otsuka, Y. 1982. Immuno-stimulation polysaccharides separated from hot water extract of *Anpelica acatiloba* Kitagawa (Yamato Tohki). *Immunology*. 47: 75.
- Linscott, W. D. and Levinson, W. E. 1969. Complement components required for virus neutralization by early immunoglobulin antibody. *Microbiology*. 64: 500-527.
- Luetting, B., Stein ller, C., Gifford, G. E., Wagner, H. and Lohmann-Matthes, M. L. 1989. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinaces purpurea*. *J. of Natl. Cancer. Institute*. 81: 669-675.
- Maeda, Y. Y., Watanabe, S. T., Chihava, C. and Rokutanda, M. 1988. Denaturation and renaturation of a  $\beta$ -1,6:1,3-glucan Lentinan, associated with expression of T cell-mediated responses. *Cancer Research*. 48: 671-675.
- Müller-Ebehard, H. J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Ann. Rev. biochem.* 57: 321-347.
- Okuda, Y., Chihara, I. and Nishioka, K. 1973. Anticomplementary activity of anti-tumor polysaccharides. *Nature*. 238: 290.
- Reid and Porter. 1988. Proteolytic system of complement. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 433-464.
- Reinhard Burger. 1986. Complement research: the impactat molecular genetics. *Immunology Today* 7: 27-29.
- Sasaki, T. and Takasuka, N. 1976. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carobohydrate Research*. 47: 99-104.
- Shimura, K., Ito, H. and Hibasami, H. 1983. Screening of host-mediated antitumor. polysaccharides by crossed immuno electro-phoresis using fresh human serum. *Japan. J. Pharmacol.* 33: 403-408.
- Shin, K. S., Kwon, K. S. and Yang, H. C. 1992. Screening and characteristics of anti-complementary polysaccharides from chinese medicinal herbs. *J. Korean. Agric. Chem. Soc.* 35: 42-50.
- Shin, K. S., Ra, K. S., Sung. H. C. and Yang, H. C. 1993. Screening of complement-system activating polysaccharide from edible plants and its action mode. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 25: 197-203.
- Yamada, H., Nakai, T., Cyong, J. C. and Otsuka, Y. 1985. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 144: 101-111.
- Yamada, H., Yanahira, S., Kiyohara, H. Cyong, J. C. and Otsuka, Y. 1986. Water-soluble glucans from the seed of *Coix laorymajobi var. Ma-Yuen*. *Phytochemistry*. 25: 129.
- Yamada, H., Cyong, J. C. and Otsuka, Y. 1986. Purification and characterization of complement activating-acidic polysaccharide from the root of *Lithospermum euchromum royle*. *Int. J. Immunopharmaco.* 8: 71-8.
- Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J. C. and Otsuka, Y. 1987. Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* *Carbohydrate. Research*. 159: 275.
- Yamada, H. 1992. Chemical and pharmacological studies on efficacy of Japanese and Chinese herbal medicines. *Kitasato Arch. of Exp. Med.* 65: 159.
- Yanaki, T., Itoh, W. and Tabata, K. 1986. Correlation between the antitumor activity of schizophyllan and its triple helix. *Agric. Biol. Chem.* 50: 2415-2416.
- Yoon, S. H., Lim, J. H., Kim, Y. S., Kim, C. H., Jo, J. H., Hwang, Y. S. 1998. Pharmacological effects of polysaccharides extracted from fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*. submission for *Kor. J. of Mycology*.